

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER KRYOKONSERVIERUNG KARDIOVASKULÄRER GEWEBE AUF DIE HUMANE IMMUNANTWORT

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von
Dipl. Humanbiologin Maria Schneider

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Bernhard Grimm

GutachterInnen:

1. Prof. Dr. Martina Seifert
2. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
3. Prof. Dr. Ulrich A. Stock

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2019

„STETS FINDET ÜBERRASCHUNG STATT
DA, WO MAN’S NICHT ERWARTET HAT“

Wilhelm Busch

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2013 bis September 2018 unter der Leitung von Frau Prof. Seifert am Berlin-Brandenburg Zentrum für regenerative Therapien und dem Institut für medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Die Promotion wurde im Rahmen der DGF-Graduiertenschule 203 „Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies“ (BSRT) durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Ersatz und Reparatur kardiovaskulärer Gewebe	1
1.1.1 Aufbau und Struktur von Herzklappen und Blutgefäßen	2
1.1.2 Klinische Anwendung von kardiovaskulärem Gewebeersatz	5
1.2 Konservierungsmethoden kardiovaskulärer Gewebe	6
1.2.1 Konventionelle Kryokonservierung	7
1.2.2 Eisfreie Kryokonservierung	7
1.2.3 Glutaraldehyd-Fixierung	8
1.2.4 Neue Entwicklungen und Ansätze	9
1.3 Immunreaktion auf Gewebeimplantate	10
2 Zielstellung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Materialien	19
3.1.1 Humane primäre Zellen und Gewebe	19
3.1.2 Gebrauchsfertige Lösungen, Medien und Kits	20
3.1.3 Reagenzien	22
3.1.4 Antikörper	24
3.1.5 Angesetzte Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer	25
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.7 Software und Geräte	29
3.2 Konservierungsmethoden	31
3.2.1 Konventionelle Kryokonservierung	31
3.2.2 Eisfreie Kryokonservierung	32
3.2.3 Fixierung mittels Glutaraldehyd	32

3.3	Methoden zur Gewebecharakterisierung	33
3.3.1	Untersuchungen zur Gewebevitalität	33
3.3.1.1	Metabolische Aktivität	33
3.3.1.2	Detektion nekrotischer Zellen im Gewebe	33
3.3.1.3	Detektion apoptotischer Zellen im Gewebe	34
3.3.2	Herstellung von konditioniertem Medium	34
3.3.3	Bestimmung der Zytokinfreisetzung	35
3.3.3.1	Multiplex-Assay	35
3.3.3.2	ELISA	35
3.3.4	Histologische Methoden	36
3.3.4.1	Herstellung von Kryo-Gewebeschnitten	36
3.3.4.2	H&E-Färbung	37
3.3.4.3	TUNEL-Färbung	37
3.3.4.4	Immunhistochemischer Nachweis von IgG	38
3.3.4.5	Immunfluoreszenzfärbung	38
3.3.5	Komplementaktivierungs-Assay	39
3.4	Zellbiologische Methoden	40
3.4.1	Isolation von Immunzellen	40
3.4.1.1	PBMC-Isolation	40
3.4.1.2	Monozyten- und T-Zellseparation	40
3.4.1.3	PMN-Isolation	41
3.4.2	Kryokonservierung von Immunzellen	42
3.4.3	Zellkultur	42
3.4.4	Expressionsanalyse von Zellmarkern mittels Durchflusszytometrie .	43
3.5	Immunologische Assays	47
3.5.1	Endotoxinbestimmung	47
3.5.2	Migrations-Assay	49
3.5.3	Kokultur humaner Immunzellen auf Aortengewebe	51
3.5.3.1	PMN-Aktivierungs-Assay	51
3.5.3.2	Makrophagen-Polarisations-Assay	52
3.5.4	Monozytenaktivierung durch lösliche Faktoren	53
3.5.5	Immunzellproliferations-Assay	54
3.5.6	Nachweis der Induktion regulatorischer T-Zellen	55
3.6	Rasterelektronenmikroskopie	55
3.7	Statistische Methoden	56

4	Ergebnisse	57
4.1	Etablierung der Präparation und Konservierung humaner Aortengewebe . .	57
4.2	Charakterisierung konservierter humaner Aortengewebe	59
4.2.1	IFC bewahrt die typische Gewebestruktur, aber verringert die meta- bolische Aktivität	59
4.2.2	CFC induziert partiell zelluläre Nekrose und Apoptose	62
4.2.3	Die Gewebe-vermittelte Zytokinsekretion wird durch die Konservie- rungsmethode moduliert	63
4.2.3.1	TGF- β 1 wird durch IFC partiell aktiviert	65
4.2.4	Untersuchungen zu Immunglobulin-Ablagerungen	68
4.3	Immunogenitätsuntersuchungen konservierter humaner Aortengewebe <i>in vitro</i>	69
4.3.1	Überprüfung des Endotoxingehalts	69
4.3.2	Das Komplementsystem wird unabhängig von der Konservierungs- methode aktiviert	71
4.3.3	Immunzellen zeigen eine verringerte Migration zu IFC-Gewebe . .	72
4.3.4	Einfluss auf die Aktivierung humaner PMNs	74
4.3.4.1	Etablierung des PMN-Aktivierungs-Assays	74
4.3.4.2	Die Methode zur Konservierung des Gewebes hat keinen Einfluss auf die PMN-Aktivierung	77
4.3.4.3	Charakterisierung des Monozytenphänotyps nach Stimu- lation mit löslichen Faktoren einer PMN-Gewebe-Kokultur	80
4.3.5	Einfluss auf die Polarisation humaner Makrophagen	82
4.3.5.1	Etablierung des Makrophagen-Polarisations-Assays . . .	82
4.3.5.2	CFC und IFC verhindern eine M1-Polarisation	85
4.3.5.3	Die Makrophagenpolarisation wird stärker durch direkten Gewebekontakt als durch lösliche Faktoren beeinflusst . .	90
4.3.5.4	Mechanistische Untersuchungen zur TGF- β -Wirkung . .	92
4.3.6	Einfluss auf die Aktivierung humaner T-Zellen	93
4.3.6.1	Lösliche Faktoren des CFC-Gewebes verstärken die Pro- liferation	93
4.3.6.2	Lösliche Faktoren des CFC-Gewebes induzieren eine er- höhte T-Zellaktivierung	96
4.3.6.3	Regulatorische T-Zellen werden unabhängig von der Kryo- konservierungsmethode induziert	97

5 Diskussion	99
5.1 Für die Beschaffenheit des Endothels und die HLA-DR-Expression des Aortengewebes ist die Art der Kryokonservierung nicht entscheidend	100
5.2 Herkömmliche Konservierungsmethoden wie CFC und GA-Fixierung fördern die Immunogenität kardiovaskulärer Transplantate	101
5.3 IFC senkt die Immunogenität kardiovaskulärer Transplantate	108
5.4 Ausblick	112
Literaturverzeichnis	115
Abkürzungsverzeichnis	136
Abbildungsverzeichnis	140
Tabellenverzeichnis	142
Selbstständigkeitserklärung	143
Danksagung	144

Zusammenfassung

Optimale Konservierungsmethoden sind erforderlich, um die zeitnahe und bedarfsgerechte Verfügbarkeit kardiovaskulärer Transplantate für den Ersatz geschädigter Gewebe (Herzklappen oder Gefäße) zu garantieren. Die konventionelle Kryokonservierung (engl.: *Conventional Frozen Cryopreservation*, CFC) ist derzeit der methodische Goldstandard zur Konservierung kardiovaskulärer Allografts in der klinischen Anwendung. Jedoch limitieren Immunreaktionen deren Langzeitfunktionalität. Die alternative Methode der eisfreien Kryokonservierung (engl.: *Ice-free Cryopreservation*, IFC) wurde kürzlich entwickelt und erste Studien sprechen für eine reduzierte Immunogenität der IFC-Gewebe. Im Rahmen der Arbeit wurde die Reaktion des humanen Immunsystems auf allogene kardiovaskuläre Gewebe nach Anwendung unterschiedlicher Konservierungsmethoden mittels geeigneter *In-vitro*-Testsysteme umfänglich charakterisiert. Der Fokus lag dabei auf dem Vergleich der beiden Kryokonservierungsverfahren CFC und IFC. Zusätzlich wurde Glutaraldehyd (GA) -fixiertes Gewebe untersucht, um die Ergebnisse in den Gesamtkontext der Gewebekonservierung einzuordnen.

Zunächst erfolgte die Analyse der histologischen sowie metabolischen Eigenschaften des unterschiedlich konservierten humanen Aortengewebes, welches als Modellmaterial diente. Hierbei wurde festgestellt, dass die typische Gewebestruktur nach IFC erhalten blieb, jedoch die metabolische Aktivität sowie Apoptose und Nekrose des Gewebes durch IFC reduziert wurde. Dies spiegelte sich auch in der verminderten Freisetzung insbesondere proinflammatorischer Zytokine aus IFC-Gewebe wider. Nachfolgend wurden funktionelle *In-vitro*-Tests entwickelt, um die Reaktionen humaner Immunzellpopulationen auf die konservierten Gewebe differenziert zu untersuchen. Es zeigte sich deutlich, dass Polymorphkernige Leukozyten (engl.: *Polymorphonuclear Leukocytes*, PMNs) und Monozyten verstärkt in Richtung der löslichen Faktoren aus CFC- und GA-fixiertem Gewebe, jedoch nicht aus IFC-Gewebe migrieren. In Kokulturen der PMNs und Makrophagen auf dem Aortengewebe konnte bei keiner der Konservierungsmethoden eine Aktivierung der PMNs nachgewiesen werden. Ausschließlich bei Makrophagen, welche auf GA-fixiertem Gewebe kultiviert wurden, fand eine Polarisation zum M1-Phänotyp statt. Weiterhin zeigte sich, dass lediglich lösliche Faktoren des CFC-Gewebes in der Lage waren, die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in einer α CD3-stimulierten Immunzellkultur zu verstärken.

Insgesamt belegen diese Daten detailliert, dass die IFC-Methode die Eigenschaften des Gewebes selektiv moduliert und dadurch eine verringerte Aktivierung des humanen Immunsys-

tems stattfindet. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen somit, dass IFC eine aussichtsreiche Strategie zur verbesserten Konservierung kardiovaskulärer Allografts für die klinische Anwendung darstellt.

Abstract

Optimal preservation methods are needed, to ensure constant availability of biological matrices for the replacement of damaged cardiovascular structures (heart valves or vessels) for clinical use. Conventional frozen cryopreservation (CFC) is currently the gold standard for cardiovascular allograft preservation. However, inflammation and structural deterioration limit transplant durability. Evidence of attenuated immune responses against heart valve allografts has proved the recently developed method of Ice-free cryopreservation (IFC) to be a superior method. The aim of this study was to characterize the reaction of the human immune system to allogeneic cardiovascular tissues after different preservation methods with suitable test systems *in vitro*. Human aortic tissue served as a proof-of-principle material for heart valve and vascular allografts. The study focused mainly on the comparison of both cryopreservation techniques CFC and IFC. However, regarding some aspects the cryopreservation was compared to glutaraldehyde (GA) fixation, which is another common tissue preservation method.

First, the histological and metabolic features of the differently preserved aortic tissues were analyzed. Tissues preserved by IFC exhibited typical architecture but significantly lower metabolic activity and the absence of necrotic or apoptotic cells. The reduced release of pro-inflammatory cytokines and chemokines from IFC-tissue reflected these latter observations. Second, the response of distinct human immune cell populations to the preserved tissues was evaluated in functional *in-vitro*-assays. It was shown that migration of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and monocytes was significantly enhanced by soluble factors from CFC- and GA-fixed tissue, but not by factors released from IFC-tissue. In co-cultures of human PMNs and macrophages on aortic tissue, none of the preserved tissue induced activation of PMNs. Exclusively GA-fixed tissue triggered the polarization of macrophages towards a M1-phenotype. Moreover, cues from only CFC-tissue but not IFC-tissue amplified a α CD3-triggered T cell activation and proliferation.

In conclusion, IFC selectively modulates the characteristics of tissues resulting in an attenuated activation of the human immune system. Therefore, the results of this study show, that IFC treatment is a promising strategy for improved tissue preservation and storage of cardiovascular allografts for clinical use.

1 Einleitung

1.1 Ersatz und Reparatur kardiovaskulärer Gewebe

Seit 50 Jahren werden Herzen erfolgreich beim Menschen transplantiert. Im Dezember 1967 gelang dem südafrikanischen Chirurgen Christiaan Barnard die erste Herztransplantation der Welt. Nachfolgend wurden im Jahr 1968 die ersten erfolgreichen Transplantationen eines menschlichen Spenderherzens in den USA und in Europa durchgeführt.

Transplantationen einzelner humaner kardiovaskulärer Gewebe fanden jedoch schon wesentlich früher statt. 1948/49 berichteten Gross *et al.* von der erfolgreichen Transplantation humaner, arterieller Gefäße [1,2]. Im Jahr 1956 wurden die ersten humanen Aortenklappen mit guten Ergebnissen in Patienten implantiert [3] und mit deren Einführung in die klinische Praxis durch Donald Ross erlangten humane Aortenklappen ab 1962 eine zunehmend größere Bedeutung für den Ersatz geschädigter Herzklappen [4].

Erkrankungen wie Atherosklerose, rheumatisches Fieber, Endokarditis oder auch angeborene Fehlbildungen können Herzklappenerkrankungen verursachen, welche beispielsweise eine Stenose der Klappe zur Folge haben. Dies kann im weiteren Verlauf zur Herzinsuffizienz führen. Ebenso können Blutgefäße durch angeborene oder erworbene Krankheiten geschädigt und in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Die erkrankten Herzklappen und Gefäße müssen daraufhin entweder repariert oder ersetzt werden. Als Ersatz können sowohl künstliche als auch xenogene biologische Materialien (z.B. vom Schwein oder Rind) dienen. Alternativ finden die bereits erwähnten humanen Gewebetransplantate, welche als Homografts oder Allografts bezeichnet werden, Anwendung. Um die Allografts zum Zeitpunkt ihres Bedarfs zur Verfügung stellen zu können, werden diese konserviert und in Biobanken gelagert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Konservierungsmethode auf die Immunogenität humaner kardiovaskulärer Gewebe untersucht werden.

1.1.1 Aufbau und Struktur von Herzklappen und Blutgefäßen

Herzklappen Die Aorten- und Pulmonalklappe sind Taschenklappen, welche sich zwischen dem Ventrikel und den sich jeweils als Ausflussbahn anschließenden großen arteriellen Gefäßen befinden (Abb. 1A). Sie sind aus drei halbmondförmigen, dünnen Taschen (*Valvulae semilunares*) aufgebaut und verhindern als Ventile den Rückstrom des Blutes in die Herzkammern, indem sie sich während der systolischen Kontraktion öffnen und anschließend während der diastolischen Entspannungsphase schließen [5]. Die Struktur beider Klappentypen ist vergleichbar, jedoch ist die Aortenklappe robuster als die Pulmonalklappe, da sie einem höheren Druck ausgesetzt ist. Die drei Taschen der Aortenklappe sind am basalen Ende mit der Aorta verbunden, wobei die sich dabei bildende Ausbuchtung als *Sinus* bezeichnet wird (Abb. 1B). Strukturell können in den Taschen drei Gewebeschichten unterschieden werden: *Lamina fibrosa*, *Lamina spongiosa* und *Lamina ventricularis*. Die *Lamina fibrosa* ist zum *Sinus* gerichtet und besteht vor allem aus Kollagenfasern, welche für die hohe Belastbarkeit der Herzklappen sorgen. In der aus lockerem Bindegewebe bestehenden *Lamina spongiosa* sind vor allem Proteoglykane eingelagert, während die *Lamina ventricularis* vorrangig aus Elastin besteht, welches während der Diastole gedehnt und in der Systole zusammengezogen vorliegt. In allen Gewebeschichten der Taschen sind valvuläre interstitielle Zellen (engl.: *valve interstitial cells*, VICs) vorhanden (Abb. 1B, rechts). Den Abschluss der Tasche bildet eine einschichtige valvuläre Endothelzellschicht [6].

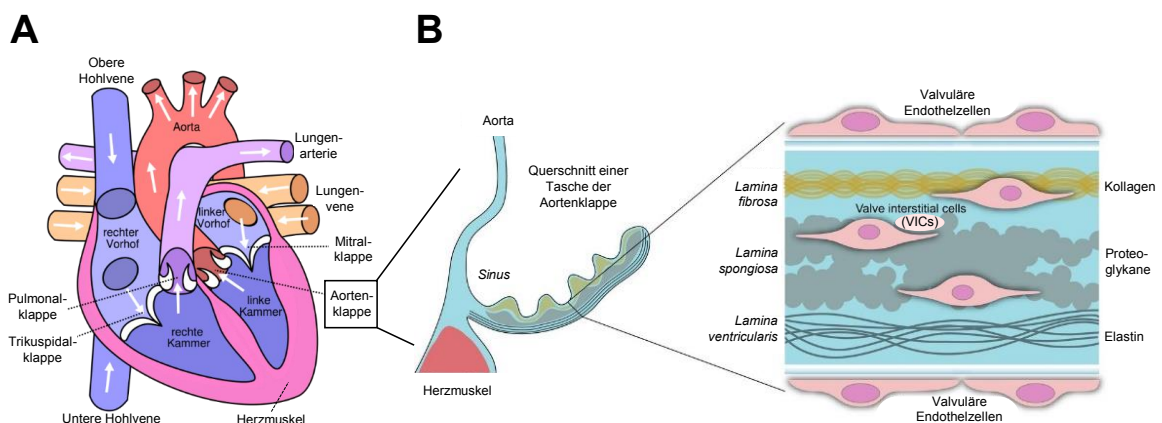


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Herzens und der Herzklappen

A) Schematische, anatomische Darstellung des Herzens mit Beschriftung (Abbildung modifiziert nach Jakob, [https://commons.wikimedia.org \[7\]](https://commons.wikimedia.org [7])), **B)** Schematischer Querschnitt einer Tasche der Aortenklappe (links). Die drei Gewebeschichten mit den vertretenen Matrix-Proteinen, Endothelzellen sowie den valvulären interstitiellen Zellen (VICs) sind rechts in der Vergrößerung dargestellt (Abbildung modifiziert nach Rutkovskiy *et al.* 2017 [6]).

VICs sind fibroblastenartige Zellen der Herzklappen. Sie sind zum einen fest in der extrazellulären Matrix (EZM) verankert, synthetisieren sie zum anderen aber auch selbst [8]. Außerdem exprimieren sie Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren und tragen somit zum *Remodelling* der EZM bei [9]. Der Großteil der VICs befindet sich unter physiologischen Bedingungen im Ruhezustand. Jedoch sind diese Zellen hoch plastisch und können z.B. als Reaktion auf mechanischen Stress, Gewebeschädigungen, Veränderungen der EZM-Organisation oder unter dem Einfluss des Transformierenden Wachstumsfaktors β (engl.: *Transforming Growth Factor β* , TGF- β) einen aktivierten Phänotyp annehmen [10, 11]. Dieser aktivierte VIC-Phänotyp ist Myofibroblasten- bzw. Osteoblasten-ähnlich und kann zur Kalzifikation der Herzklappe beitragen [6, 12].

Die valvulären Endothelzellen bilden die Grenze der Herzklappe zum Blutstrom und sind essentiell für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und der Homöostase der Herzklappe, indem sie die Permeabilität und Immunzelladhäsion regulieren sowie thrombotische Ereignisse verhindern [11]. Grundsätzlich gleichen sie sowohl funktionell als auch strukturell den vaskulären Endothelzellen der Blutgefäße (siehe unten). Studien zeigen jedoch, dass sich valvuläre Endothelzellen im Vergleich zu anderen Endothelzellsubtypen, z.B. in ihrer Reaktion auf mechanische Kräfte, unterscheiden können [13].

Blutgefäße Die Wand von Arterien und Venen ist ebenfalls aus drei Gewebeschichten aufgebaut: der *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* (auch *Tunica externa* genannt) (Abb. 2). Die *Tunica intima* ist die zum Blutstrom gerichtete Schicht des Gefäßes und von einer einschichtigen Endothelzellschicht bedeckt. Zur *Tunica intima* zählt weiterhin die unter dem Endothel liegende Schicht aus lockerem Bindegewebe (*Stratum subendotheliale*), in welcher glatte Muskelzellen oder auch Immunzellen eingelagert sein können [5]. Bei Arterien, teilweise auch bei Venen, ist die *Tunica media* von der *Tunica intima* durch eine kompakte Schicht elastischer Fasern abgegrenzt. In der *Tunica media* sind neben Kollagen- und Elastinfasern hauptsächlich glatte Muskelzellen vorhanden. Die äußere Schicht der Blutgefäße, *Tunica adventitia* oder *externa*, ist ebenfalls aus lockerem Bindegewebe mit Kollagen und Elastin als Bestandteilen, aufgebaut. Diese von Nerven durchzogene Schicht verankert die Blutgefäße in ihrer Umgebung und beinhaltet Fibroblasten sowie vaskuläre Stammzellen [14].

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Aortengewebe als Modell- und „*Proof of Principle*“-Gewebe für kardiovaskuläre Matrices genutzt. Der strukturelle Aufbau der Aorta ist am Beispiel des generellen Wandaufbaus von Arterien in Abb. 2 verdeutlicht.

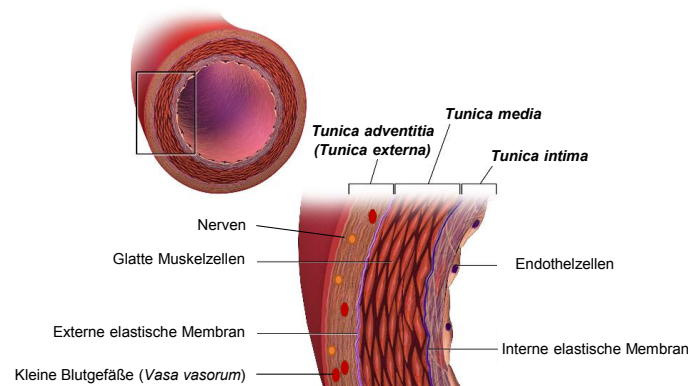


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus von Arterien

Ein schematischer Querschnitt eines arteriellen Blutgefäßes ist dargestellt (oben). Darunter sind in einem Ausschnitt die drei Schichten mit den darin vorkommenden Zellen und Strukturen beschriftet. *Vasa Vasorum* kommen nur in großen Arterien vor (Abbildung modifiziert nach *Bruce Blaus*, <https://commons.wikimedia.org> [15]).

Bei großen Gefäßen, wie z.B. der Aorta, sind in der *Tunica adventitia* zusätzlich kleine Blutgefäße (*Vasa Vasorum*) für die Versorgung der Gefäßwand vorhanden. Die Aorta gehört zu den Arterien des elastischen Typs, wodurch in der *Tunica media* überwiegend elastische Fasern und weniger glatte Muskelzellen vorhanden sind [5].

Die dominanten Zelltypen arterieller Gefäße sind demnach Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Jedoch können auch diese beiden Zelltypen im Hinblick auf ihre Interaktion mit Immunzellen sehr heterogen sein. Diese funktionellen Unterschiede sind meist abhängig von der anatomischen Position der Blutgefäße [14]. In allen drei Schichten der Blutgefäße können außerdem Leukozyten vorhanden sein, wobei deren Anzahl in Folge von Gewebeschädigungen und Entzündungen drastisch ansteigt [14].

Endothelzellen exprimieren die Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *Major Histocompatibility Complex*, MHC)-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle und sind somit in der Lage, den T-Zellen Antigene zu präsentieren, was vor allem im Kontext von Transplantationen eine wichtige Rolle spielt [16]. Glatte Muskelzellen exprimieren ebenfalls MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle, jedoch in geringerem Umfang als Endothelzellen [17]. Im Ruhezustand sind die glatten Muskelzellen vor allem für die Kontraktion und die Synthese der EZM verantwortlich. Ebenso produzieren sie Zytokine wie Interleukine (IL) IL-1, IL-6 oder TGF- β 1 [14, 18]. Durch verschiedene Stimuli können die glatten Muskelzellen darüber hinaus auch einen proliferierenden, aktivierten Phänotyp annehmen und eine Rolle in Entzündungsreaktionen der Blutgefäße, wie z.B. bei Atherosklerose, spielen [19].

1.1.2 Klinische Anwendung von kardiovaskulärem Gewebeersatz

Herzklappen In Deutschland wurden im Jahr 2016 mehr als 33.000 Herzklappenoperationen durchgeführt [20]. Erkrankte Herzklappen können entweder repariert oder ersetzt werden, wobei als Ersatz zwei prinzipielle Möglichkeiten in Frage kommen: mechanische oder biologische Klappenprothesen. Mechanische Klappen, welche meist aus Metall bestehen, halten nach Implantation üblicherweise ein Leben lang, jedoch entsprechen die hämodynamischen Eigenschaften nicht denen der normalen Physiologie. Außerdem müssen Patienten dauerhaft Antikoagulanzen einnehmen, um eine Thrombusbildung zu vermeiden, wodurch vermehrt Komplikationen durch Blutungen auftreten [21, 22]. Ein biologischer Herzklappenersatz hat den Vorteil, dass die Patienten keine antikoagulatorische Therapie benötigen und die Klappen sehr gute hämodynamische Eigenschaften aufweisen [23, 24]. Der Nachteil biologischer Herzklappenprothesen ist jedoch ihre limitierte Haltbarkeit. Auf Grund immunologischer Reaktionen weisen die biologischen Herzklappenprothesen in älteren Patienten nach ca. 15 Jahren und in jüngeren Patienten wesentlich schneller strukturelle Veränderungen und Kalzifikationen auf, was mit einer verminderten Funktionsfähigkeit einhergeht. In diesen Fällen besteht die Notwendigkeit einer Reoperation und neuen Herzklappenprothese [21, 25]. Die Verwendung biologischer Prothesen stieg im Verlauf der letzten zehn Jahre dennoch stetig an. In der Mehrzahl der Fälle (> 85 %) werden gegenwärtig biologische Herzklappen verwendet [20]. Die Entscheidung, ob eine biologische oder mechanische Herzklappe eingesetzt wird, hängt vom individuellen gesundheitlichen Status des Patienten ab. Im Hinblick auf die Risiko-Nutzen-Abschätzung empfehlen europäische und amerikanische Regularien den Einsatz mechanischer Klappen eher für Patienten unter 60 Jahren und biologischer Prothesen bevorzugt für Patienten über 60 Jahren [23].

Biologische Herzklappentransplantate können xenogen oder allogenen sein. Als xenogene Gewebe werden meist porcine Aortenklappen oder porcines sowie bovines Perikard genutzt und zum Transplantat verarbeitet [23]. Allografts hingegen sind humane Aorten- oder Pulmonalklappen mit ihrem angrenzenden Gefäß. Die humanen Herzklappen werden von Körperspendern oder Empfängern einer Herztransplantation gewonnen. Daher weisen Allografts als entscheidenden Nachteil eine limitierte Verfügbarkeit. Allografts zeigen jedoch eine bessere Resistenz gegenüber Infektionen im Vergleich zu porcinen oder bovinen Herzklappenprothesen und finden daher meist bei Patienten mit akuter Endokarditis Anwendung. Weiterhin kommen besonders bei jungen Patienten Allografts in der pulmonalen Position zum Einsatz [24, 26, 27].

Blutgefäße In der Gefäßchirurgie gibt es ebenfalls unterschiedliche Möglichkeiten, fehlgebildete oder geschädigte Blutgefäße zu reparieren bzw. zu ersetzen. Synthetische Prothesen, welche z.B. aus Polyethylenterephthalat (PET) hergestellt werden, finden vor allem als Ersatz für Gefäße mit größerem Lumen (> 8 mm) Anwendung [28]. Bei kleineren Gefäßdurchmessern weisen synthetische Prothesen auf Grund ihrer geringen Durchlässigkeit jedoch Limitationen auf. Deshalb ist in diesen Fällen die beste Option, die patienteneigenen (autologen) Arterien oder Venen zu verwenden [29]. Nicht immer sind jedoch autologe Gefäße nutzbar. In der klinischen Praxis kommen deshalb auch allogene arterielle und venöse Gefäße für den Ersatz von Blutgefäßen zum Einsatz. Vor allem die Oberschenkelarterie sowie die aufsteigende und absteigende Aorta werden bei Patienten als Allografts implantiert, um zum Beispiel angeborene Herzfehler oder periphere arterielle Verschlusskrankheiten zu behandeln sowie infizierte Arterien oder Gefäßprothesen zu ersetzen [30]. Außerdem werden Gefäßallografts z.B. für Bypass-Operationen [31, 32], die Revaskularisierung nach Lebertransplantationen [33, 34] oder als *Shunts* für Dialysepatienten benötigt [35, 36].

1.2 Konservierungsmethoden kardiovaskulärer Gewebe

Um biologischen Gewebeersatz für Herzklappen und Blutgefäße zum Zeitpunkt ihres Bedarfs zur Verfügung stellen zu können, sind optimale Konservierungsmethoden von großem medizinischem Interesse. In Biobanken können konservierte Gewebe gelagert, auf mikrobielle Kontaminationen überprüft und auf Anfrage für den Einsatz im Patienten bereitgestellt werden. Die Kryokonservierung, also das Einfrieren von Gewebe, ist die meist genutzte Methode der Konservierung und zur Lagerung, wobei zwei Formen unterschieden werden. Die konventionelle Kryokonservierung (engl.: *Conventional Frozen Cryopreservation*, CFC) stellt zurzeit den Standard zur Konservierung kardiovaskulärer Allografts für die klinische Anwendung dar [30, 37]. Eine weitere Form der Kryokonservierung ist die Vitrifizierung, auch eisfreie Kryokonservierung (engl.: *Ice-free Cryopreservation*, IFC) genannt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Gewebe chemisch zu fixieren und dadurch haltbar zu machen. Die Fixierung mittels Glutaraldehyd (GA) wird vor allem für die Konservierung von xenogenem Gewebeersatz angewendet. Neuere Ansätze zur Konservierung kardiovaskulärer Transplantate streben eine Dezellularisierung des Gewebes an. Im Folgenden soll auf die einzelnen Konservierungsmethoden genauer eingegangen werden.

1.2.1 Konventionelle Kryokonservierung

Die durch Kryokonservierung erreichten niedrigen Temperaturen senken die biologischen Prozesse in der Zelle auf ein Minimum herab und erhalten somit die Funktionalität der Zellen im Gewebe über einen längeren Zeitraum. Jedoch bilden sich durch zu schnelles Abkühlen intrazelluläre Eiskristalle, welche Zellstrukturen zerstören können. Zu langsames Abkühlen hingegen führt zur extrazellulären Bildung von Eiskristallen, welche die Zellen und das Gewebe ebenfalls mechanisch schädigen können. Außerdem verändert sich durch die extrazellulären Eiskristalle der osmotische Gradient, welcher zum osmotischen Schock der Zellen führen kann [38]. Durch eine optimale Abkühlungsrate und das Hinzufügen kryoprotektiver Substanzen, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), ist eine Reduktion von Kryoschäden des Gewebes möglich.

Bei der Konventionellen Kryokonservierung (CFC) werden die Allografts in Zellkulturmedium, welches 10 % humanes oder bovines Serum und 10 % DMSO enthält, eingefroren. Während des Einfrierprozesses wird das Gewebe unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen mit einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Das Gewebe wird dann in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs bei ca. -160 °C gelagert [39] und vor der Implantation nach einem definierten Protokoll wieder aufgetaut. Kryokonservierte Allografts zeigen eine gute Langzeitfunktionalität, mit geringen Komplikationen und einer guten Belastbarkeit [26, 40, 41]. Andere Studien weisen jedoch auch auf eine schnelle Degeneration von Herzklappen-Allografts vor allem bei jungen Patienten sowie auf Limitationen in der Langzeitfunktionalität arterieller Allografts hin [42, 43]. Untersuchungen mittels Raman-Spektroskopie und Multiphotonenmikroskopie wiesen nach, dass vor allem die Struktur der EZM durch CFC verändert und zerstört wurde [44, 45]. Freigesetzte zelluläre Faktoren von durch Eiskristalle zerstörten oder nekrotischen Zellen und geschädigte EZM-Fasern lösen Reaktionen des Immunsystems (siehe Abschnitt 1.3) sowie Kalzifikationsprozesse aus und führen schlussendlich zu Funktionseinschränkungen des Transplantats [46, 47].

1.2.2 Eisfreie Kryokonservierung

Die eisfreie Kryokonservierung wird durch Vitrifizierung erreicht. Als Vitrifizierung (von lat. *vitrum*, Glas) bezeichnet man die Verfestigung einer Flüssigkeit beim Abkühlen unter Zunahme der Viskosität in Abwesenheit einer Eiskristallbildung. Durch die ausbleibende Kristallisation entsteht ein amorphes Material (Glas). Dieser Prozess kann durch eine definierte Zusammensetzung der Flüssigkeit und durch schnelles Abkühlen erreicht werden [48].

Die Annahme, dass die schnelle Zerstörung der Herzklappen-Allografts auf die interstitielle Eiskristallbildung zurückzuführen ist, führte zur Entwicklung der eisfreien Kryokonservierung (IFC) von kardiovaskulären Allografts [39]. Bei dieser Methode werden die Gewebe in der IFC-Lösung VS83 mittels ca. -135°C -kaltem Methylbutan schnell eingefroren. VS83 besteht aus Euro-Collins-Lösung mit anteilig 83 % der drei kryoprotektiven Substanzen Formamid, DMSO und 1,2-Propandiol. Die Glasübergangstemperatur für VS83 liegt zwar bei -119°C , jedoch geht aus Experimenten hervor, dass die kardiovaskulären Gewebe auch bei -80°C über einen längeren Zeitraum gelagert und transportiert werden können [39]. Diese Eigenschaft bringt somit auch einen logistischen und ökonomischen Vorteil mit sich, da der Transport der Proben nicht mit flüssigem Stickstoff in einem Tieftemperatur-Container erfolgen muss, sondern lediglich Temperaturen von -80°C benötigt. Analysen von humanem kardiovaskulärem Gewebe, welches mittels IFC konserviert wurde, zeigten einen besseren Erhalt der EZM-Strukturen [45,49]. Für porcine Arterien konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die hämokompatiblen Eigenschaften nach IFC erhalten bleiben, jedoch die Zellvitalität im Vergleich zu nativem oder CFC-Gewebe reduziert ist [50]. *In-vivo*-Studien im Schaf, wiesen für IFC-konservierte Herzklappen-Allografts gute hämodynamische Eigenschaften, ein gutes Langzeitverhalten und langfristige strukturelle Integrität nach [51]. Außerdem waren die allogenen IFC-Herzklappen weniger verdickt und verzeichneten eine geringere Infiltration von Immunzellen sowohl nach kurzen als auch nach langen Zeiträumen Implantation im Schaf [51, 52]. Dies war jedoch nur für den allogenen IFC-Gewebeersatz der Fall. Bei der Transplantation von xenogenen (porcinen) IFC- bzw. allogenen CFC-Herzklappen im Schaf fand eine Verdickung und Immunzellinfiltration statt, was auf starke Reaktionen des ovinen Immunsystems in diesen Settings hinweist [51–53]. Bei Untersuchungen zur Reaktion des humanen Immunsystems *in vitro* konnte jedoch eine verminderte Immunzellantwort, vor allem humaner T-Zellen, auf xenogenes IFC-Herzklappengewebe festgestellt werden [54]. Die Reaktion des humanen Immunsystems auf allogenes IFC-Gewebe wurde bisher noch nicht untersucht und soll im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* adressiert werden.

1.2.3 Glutaraldehyd-Fixierung

Durch chemisches *Cross-Linking* mittels Glutaraldehyd (GA) können biologische Strukturen ebenfalls konserviert werden. Das GA durchdringt dabei das Gewebe, wobei die Aldehyd-Gruppen mit den Aminosäuren der Proteine reagieren. Diese kovalente Bindung führt zur Vernetzung der Proteine und ist irreversibel [55].

Die GA-Fixierung wird vor allem für die Konservierung xenogener kardiovaskulärer Gewebe angewendet. Neben der Haltbarmachung des Gewebes dient die Fixierung hierbei auch zur Sterilisierung und Reduzierung der xenogenen Antigene [24]. GA führt aber auch zu einer Versteifung des Gewebes [56]. In mindestens 50 % der Fälle sind GA-fixierte biologische Herzklappen-Prothesen 10-15 Jahre nach Implantation im Patienten zerstört und weisen massive Kalzifikationen auf [57, 58]. GA fixiert und inaktiviert die interstitiellen Zellen, wodurch von Anfang an kein Remodelling der EZM mehr stattfinden kann. Dem Modell von Schoen *et al.* nach bilden die inaktiven Zellen, welche durch die Fixierung nicht entfernt werden können, Nukleationskeime für Kalzifikationsprozesse. GA-fixierte Zellen können Kalzium aus dem Zellinneren nicht mehr nach außen transportieren. Kalzium strömt aber weiterhin aus dem Extrazellularraum in die Zelle ein, wodurch der intrazelluläre Kalziumspiegel steigt. Phosphorylierte Moleküle (wie z.B. Phospholipide) binden das Kalzium und bilden somit den Start der Mineralisierungskaskade [46]. Außerdem spielen auch bei GA-fixierten Herzklappen Reaktionen des Immunsystems die wichtigste Rolle im Hinblick auf eine stattfindende Gewebeerstörung. So haben viele Studien eine hohe Anzahl infiltrierter Immunzellen in den Herzklappen nach Explantation nachweisen können [59–61].

1.2.4 Neue Entwicklungen und Ansätze

Um die derzeitigen Limitationen kardiovaskulären Gewebeersatzes, wie die eingeschränkte Verfügbarkeit, schlechte hämodynamische Eigenschaften und Immunogenität zu überwinden, wird seit Langem an Alternativen geforscht. *Tissue Engineering* ist eine vielversprechende Alternative, um nicht-immunogene, biologische aktive, kardiovaskuläre Transplantate herzustellen [62, 63]. Unterschiedlichste synthetische, biokompatible Polymere, welche mit vaskulären (im besten Fall autologen) Zellen, Endothelzellen und/oder mesenchymalen Stromazellen (MSCs) besiedelt werden, finden hierbei Anwendung [64–67]. Obwohl die Anzahl präklinischer Studien sehr groß und vielfältig ist, sind nur wenige Ansätze bisher in klinischen Studien vertreten. Der von Lawson *et al.* beschriebene Ansatz zählt beispielsweise zu den wenigen Studien, welche mittlerweile in der klinischen Phase 3 untersucht und angewendet werden (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03183245 [68]). Für die Herstellung des vaskulären Transplantats expandierten Lawson *et al.* humane glatte Muskelzellen und siedelten diese in einem Bioreaktor auf ein Polyglycolsäure-Gerüst [69].

Um die guten hämodynamischen Eigenschaften der Allo- und Xenografts zu erhalten, aber deren Probleme der Immunogenität zu umgehen, wurden unterschiedliche Methoden zur

Dezellularisierung der Gewebe, welche meist auf Detergenzien und Enzymen basieren, entwickelt. Präklinische Studien ergaben, dass durch die Entfernung der Zellen in xenogenem Gewebe die Immunreaktion in den Empfängerorganismen reduziert wurde und die kardiovaskulären Transplantate vergleichsweise gute Leistungen erbrachten [70–72]. Durch Dezellularisierung kann auch der Großteil des xenogenen Antigens α -Gal entfernt werden [56]. Jedoch zeigten Studien mit dezellularisierten porcinen Herzklappen im Patienten keine erfolversprechenden Ergebnisse bzw. sogar Misserfolge [73, 74]. Dezellularisierte allogene Herzklappen scheinen hingegen mittelfristig bessere Eigenschaften als kryokonservierte Allografts aufzuweisen [75–77]. Langfristig (10 Jahre *Follow-up*) traten jedoch ebenfalls Probleme durch Kalzifikation und Fibrosierung bei den dezellularisierten Allografts auf, was zu höheren Reoperationsraten, verglichen zu kryokonservierten Allografts, führte [78]. Immunreaktionen bei allogenen, dezellularisierten Geweben können beispielsweise auf die starken Veränderungen der EZM durch die Dezellularisierungsprozesse zurückzuführen sein [79, 80].

1.3 Immunreaktion auf Gewebeimplantate

Wie aus den zuvor beschriebenen Abschnitten bereits deutlich hervorgeht, spielt die Antwort des Immunsystems die entscheidende Rolle im Hinblick auf die kurz- und langfristige Kompatibilität und Funktionsfähigkeit von Gewebetransplantaten. Das Immunsystem wird bei eindringenden Pathogenen ins Gewebe alarmiert und stellt sofortige Abwehrmechanismen bereit. Jedoch findet auch ohne die Anwesenheit von Pathogenen eine Immunreaktion statt, wenn Gewebe geschädigt ist und/oder synthetisches, xenogenes oder allogen Material implantiert wurde. Die Immunreaktion wird in diesem Fall als „sterile Entzündung“ bezeichnet. Diese akute Reaktion des Immunsystems ist ein normaler und wesentlicher Bestandteil der Wundheilung und Gewebereparatur sowie beim *Remodelling* des Gewebes [81]. Dabei spielt vor allem das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Aber auch das adaptive Immunsystem trägt zur Reaktion auf Gewebeimplantate bei [82]. Entscheidend hierbei ist das Gleichgewicht zwischen den ablaufenden Prozessen der Entzündung und Regeneration. Verläuft die Entzündungsreaktion kontrolliert und kommt es schnell wieder zu deren Auflösung, kann eine Regeneration und Wundheilung erfolgen. Bei überschießenden und andauernden Reaktionen resultieren jedoch chronische Entzündungen oder Fibrose und damit letztlich eine Zerstörung des Gewebes. Im Folgenden soll ein Überblick über die stattfindenden Mechanismen während der Reaktion des Immunsystems auf Gewebeimplantate und Gewebeschäden gegeben werden. Ein schematischer Überblick ist Abb. 3A zu entnehmen.

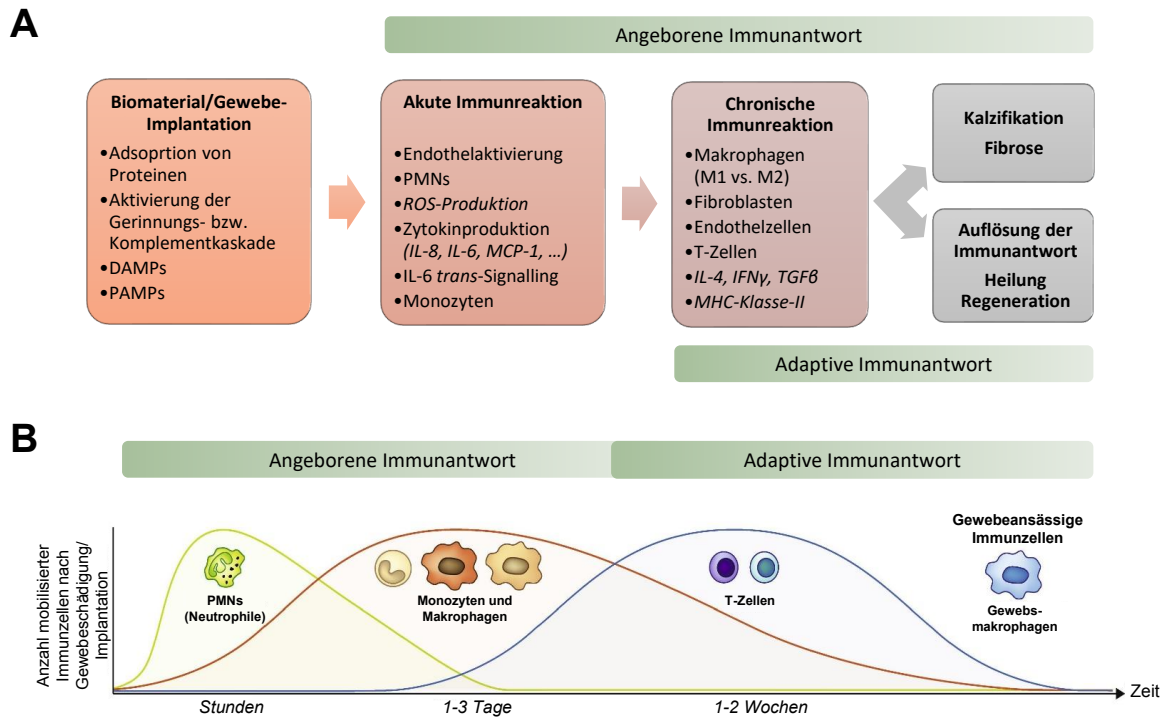


Abbildung 3: Schematische Darstellung der ablaufenden Immunreaktion nach Biomaterial- bzw. Gewebeimplantation

A) Überblick der stattfindenden angeborenen und adaptiven Mechanismen während der akuten und chronischen Phase der Reaktion auf Implantate. Ausführliche Erläuterungen siehe Text (Abbildung modifiziert nach van Loon *et al.*, 2013 [83]). **B)** Kinetik der infiltrierten Immunzellen nach Gewebeschädigung bzw. -implantation. Die relative Menge von PMNs, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt nach Beginn der Immunreaktion ist dargestellt (Abbildung modifiziert nach Julier *et al.*, 2017 [82]).

Die verschiedenen Immunzellen folgen im Verlauf einer Immunreaktion zeitlich aufeinander, wobei das Maximum der Anzahl Polymorphkerniger Leukozyten (engl.: *Polymorphonuclear Leukocytes*, PMNs) (Granulozyten/Neutrophile) bereits nach ein paar Stunden am Ort der Gewebeschädigung erreicht ist. Monozyten und Makrophagen sind vor allem in den ersten drei Tagen der Immunreaktion anzutreffen und T-Zellen sowie polarisierte Makrophagen sind noch 1-2 Wochen nach Beginn der Immunantwort vorhanden (siehe Abb. 3B).

Blutgerinnungs- und Komplementsystemkaskade Implantation von Gewebeersatz oder anderen Biomaterialien geht meist mit einer Verletzung des umliegenden Gewebes sowie dessen Blutgefäßen einher. Im Fall des kardiovaskulären Gewebeersatzes ist der Kontakt mit dem Blutsystem unumgänglich. Fehlt eine körpereigene Endothelzellschicht, können Proteine des Blutes und der interstitiellen Flüssigkeit an der Oberfläche des Biomaterials oder des Gewebes adsorbieren [84]. Diese Schicht aus Proteinen kann den Start für die Blutgerinnungs- und Komplementsystemkaskade liefern, wodurch Thrombozyten und Im-

munzellen an den Ort der Implantation gelockt werden [85]. So führt die Aktivierung der Faktoren XII (FXII) und III (Gewebefaktor) kaskadenförmig zur Bildung von Thrombin und final zur Vernetzung von Fibrin (Blutgerinnsel). FXII wird beispielsweise durch Kontakt mit Kollagen oder (negativ) geladenen Oberflächen aktiviert. Der Gewebefaktor wird hingegen von beschädigten Zellen selbst exprimiert [84].

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei Wege ausgelöst werden. Biomaterialien und Gewebeimplantate triggern vor allem die Klassische und die Alternative Komplementkaskade, wobei der Klassische Weg durch Antikörper (Immunglobulin (Ig) M oder IgG), welche an die Gewebe/Material-Oberfläche gebunden haben und der Alternative Weg durch körperfremde Materialien direkt ausgelöst wird [86]. Die grob vereinfachten Schritte des Klassischen Wegs beinhalten, dass der Komplementfaktor C1q an das angelagerte IgG bindet. Daran binden dann die weiteren Komplementfaktoren C4 und C2, welche gespalten werden und dadurch die C3-Konvertase bilden [87, 88]. C3 wird dadurch in C3b und C3a gespalten, wobei C3b sich ebenfalls an der Oberfläche anlagert und als Opsonin wirkt. C3a sowie das sich später in der Kaskade abspaltende C5a sind Anaphylatoxine. Diese tragen unter anderem durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Anlockung von PMNs (Granulozyten/Neutrophile) und Monozyten zum Einsetzen der Immunreaktion bei [88].

Die beiden Systeme der Komplement- und Blutgerinnungskaskade agieren nicht separat voneinander sondern befinden sich im *Cross-Talk* miteinander und können sich gegenseitig verstärken. Letztendlich führt die Aktivierung beider Systeme zur Thrombozytenaktivierung und zur Anlockung sowie Aktivierung von PMNs und nachfolgend weiteren Immunzellen. [85].

DAMPs Eine sterile Entzündungsreaktion im Gewebe wird maßgeblich durch sogenannte DAMPs (engl.: *Damage/Danger-Associated Molecular Pattern*) oder Alarmine ausgelöst. Endogene DAMPs werden typischerweise von gestressten, geschädigten oder nekrotischen Zellen des Gewebes freigesetzt. Zu DAMPs gehören z.B. das Chromatin-assoziierte Protein *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1), Hitzeschockproteine, extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP), Nukleinsäuren (RNA und mitochondriale sowie genomische DNA) und Zytokine wie IL-1 α oder IL-33 [81]. DAMPs aktivieren *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) zu denen z.B. *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) gehören. TLRs werden hauptsächlich von monozytären Zellen, wie gewebeansässigen Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen, aber auch von B- und T-Zellen sowie von Endothelzellen exprimiert [89, 90]. Eine Aktivierung der TLRs führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, welcher die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 β

oder IL-6 sowie von Chemoattractanten für Neutrophile und Monozyten steuern. TLR2 und TLR4 erkennen unter anderem das intrazelluläre Protein HMGB1 oder die Hitzeschockproteine [91, 92]. IL-1 α und IL-33 werden passiv von gestressten oder nekrotischen Zellen mit geschädigter Membran freigesetzt und wirken so als Alarmine. IL-1 α , welches von nekrotischen Zellen freigesetzt wird, stimuliert zum einen Gewebezellen, wie Fibroblasten, welche daraufhin Chemokine zur Rekrutierung von Neutrophilen sezernieren. Zum anderen stimuliert IL-1 α gewebeansässige Makrophagen, welche zusätzliches IL-1 α und IL-1 β freisetzen und somit die Chemokinproduktion noch verstärken [81, 93]. Außerdem fördert die Freisetzung von IL-1 α von geschädigten Endothelzellen die Infiltration von T-Zellen im Zuge einer Rejektion arterieller Allografts [94].

Auch Fragmente von EZM-Komponenten wie Hyaluronsäure, Kollagen, Elastin, Fibronectin oder Laminin gehören zu den DAMPs [95]. Eine Fragmentierung der EZM kann durch enzymatische Spaltung (vor allem durch Metalloproteinasen) oder mechanische Kräfte hervorgerufen werden. Fragmente von Hyaluronsäure oder Biglycan werden ebenfalls vom TLR2 und TLR4 erkannt [96–98]. Außerdem besitzen Neutrophile unter anderem Rezeptoren, welche bestimmte Peptidsequenzen erkennen, die bei diesen EZM-Proteinfragmenten zu finden sind. Diese Peptide können somit als Chemoattractant fungieren [99, 100].

PAMPs Natürlich kann eine Entzündungsreaktion auf allogenes oder xenogenes Gewebe auch durch Pathogene ausgelöst werden, wenn die Transplantate nicht unter sterilen Bedingungen entnommen oder während der Präparation mikrobiell kontaminiert wurden. Zu den sogenannten PAMPs (engl.: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) gehört das Lipopolysaccharid (LPS). LPS, was auch als Endotoxin bezeichnet wird, ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und bindet an den TLR4, wodurch die zuvor beschriebenen pro-inflammatorischen Prozesse ausgelöst werden [101]. Eine Endotoxinkontamination von Gewebetransplantaten oder Biomaterialien sollte selbstverständlich vor Implantation getestet und ausgeschlossen werden.

PMNs Polymorphnukleäre Leukozyten (PMNs, Granulozyten/Neutrophile) sind die ersten Immunzellen, welche zum Ort der Gewebeschädigung rekrutiert werden. Im Blut zirkulierende PMNs migrieren auf Grund der aktivierten Komplementfaktoren und chemotaktischen Signalen, vor allem C-X-C-Motiv-Ligand (CXCL) 1 und CXCL8 (IL-8), ins Gewebe. Diese Faktoren werden von Thrombozyten, geschädigten Gewebezellen, Endothelzellen und gewebeansässigen Immunzellen sezerniert [102]. PMNs haben *in vivo* und *in vitro* nur eine kurze Lebensdauer von ca. 12-24 Stunden. Nach Migration ins Gewebe und Aktivierung

durch Zytokine, Chemokine und DAMPs kann sich ihre Lebensdauer auf 1-3 Tage verlängern [103]. Neben ihren phagozytotischen Eigenschaften setzen PMNs nach Aktivierung Proteasen und anti-mikrobielle Faktoren aus ihren Granula frei, welche sich sowohl gegen Pathogene richten als auch EZM degradieren können [104, 105]. Zusätzlich werden reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *Reactive Oxygen Species*, ROS) und Leukotriene von aktivierten PMNs produziert [105, 106]. Zusammen bilden diese Faktoren wiederum Stimuli zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer PMNs sowie zur Interaktion mit allen anderen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems [107]. Zusätzlich zu ihrem inflammatorischen Charakter stimulieren PMNs auch die Angiogenese und Zellproliferation bei [108, 109]. Weiterhin deuten Hinweise sowohl von *in-vitro*- als auch von *in-vivo*-Studien darauf hin, dass die Art der PMN-Aktivierung und -Polarisation entscheidend für die spätere Modulation der Immunantwort durch M2-Makrophagen und T-Helferzellen im Hinblick auf die Wundheilung ist und PMNs die T-Zellaktivierung hemmen können [110–112]. Die Infiltration neuer PMNs wird schnell nach deren Rekrutierung wieder gestoppt und apoptotische PMNs sowie Zelltrümmer werden durch rekrutierte Monozyten und Makrophagen beseitigt [105]. In der Phase der Umstellung von PMN- auf Monozytenmigration ins Gewebe spielen beispielsweise IL-6 und der lösliche Rezeptor sIL-6R eine wichtige Rolle. Aktivierte, wie auch apoptotische PMNs spalten IL-6R von ihrer Oberfläche ab [113, 114]. Dieser bindet IL-6, welches sowohl von Immunzellen als auch von Zellen des Gewebes gebildet wurde. Der sIL-6R-IL-6-Komplex kann dann an das Glykoprotein 130 (gp130) der Endothelzellen binden [115]. Der als IL-6-*trans*-Signalling bezeichnete Prozess reguliert in den Endothelzellen unter anderem die Expression des Monozyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) hoch und stimuliert somit die Migration von Monozyten, jedoch nicht mehr von PMNs, aus dem Blutstrom ins Gewebe [116]. PMNs tragen so letztendlich zu ihrer eigenen Beseitigung bei und leiten damit bereits die Auflösung der Immunreaktion ein.

Monozyten und Makrophagen Neben ihrer Funktion, Zelltrümmer und apoptotische PMNs zu phagozytieren, tragen Makrophagen aktiv zur Wundheilung und Geweberegeneration bei. In den meisten Geweben ist bereits eine Population von gewebeansässigen Makrophagen (engl.: *Tissue-resident Macrophages*) vorhanden, welche, wie zuvor erläutert, Signale für die PMN-Migration freisetzen. Der Großteil der Makrophagen, welche bei einer Gewebeschädigung/Entzündung anzutreffen sind, entstammen aber aus den vom Blut rekrutierten Monozyten (engl.: *Monocyte-derived Macrophages*) [117]. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen sind sehr heterogene Zellpopulationen.

Monozyten zirkulieren im Blut und werden beim Menschen anhand der Expression ihrer Oberflächenmarker CD14 (LPS-Rezeptor) und CD16 (Fc γ -Rezeptor) in drei Populationen unterteilt: (1) klassische Monozyten (CD14⁺⁺ CD16⁻), (2) intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺ CD16⁺) und (3) nicht-klassische Monozyten (CD14⁺ CD16⁺⁺). Die nicht-klassischen, CD16-exprimierenden Monozyten sind gereifter und exprimieren das humane Leukozytenantigen DR (HLA-DR) stärker als die klassischen CD14⁺⁺ Monozyten [118, 119]. Vor allem die klassischen CD14⁺⁺ Monozyten migrieren bei Entzündungen ins Gewebe, was unter anderem durch die Adhäsion mittels CD62L und ihrem Chemokin-Rezeptor CCR2 für die Erkennung von MCP-1 vermittelt wird [120, 121]. Nicht-klassische CD16⁺⁺ Monozyten sind hingegen vorrangig für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion und Homöostase verantwortlich. Sie exprimieren weniger CD62L und patrouillieren deshalb auf der Endothelzellschicht [119]. Im späteren Verlauf einer Entzündung akkumulieren sie erst im Gewebe und sind somit vor allem für Wundheilung, Angiogenese und Fibrose verantwortlich [122].

Ins Gewebe migrierte Monozyten differenzieren zu Makrophagen. Entsprechend der sie umgebenden Signale polarisieren Makrophagen und halten entweder die Gewebekomöostase aufrecht oder aber tragen zur chronischen Entzündung, Fibrose oder Regeneration des Gewebes bei (Abb. 4A). Für diese sehr diversen und konträren Funktionen sind unterschiedlich polarisierte Makrophagen-Subtypen mit entsprechenden phänotypischen Merkmalen verantwortlich [123]. Pro-inflammatorische Signale in der Umgebung, wie Interferon (IFN)- γ oder LPS fördern die Polarisation zu klassisch-aktivierten M1-Makrophagen und anti-inflammatorische Signale, wie IL-4 oder IL-10 polarisieren Makrophagen zum alternativen M2-Phänotyp [124, 125].

Jedoch ist die Polarisation der Makrophagen als kontinuierliches Spektrum zu verstehen, in welchem unter anderem M2a, M2b und M2c-Subtypen existieren, Zellen auch einen gemischten Phänotyp annehmen können und eine Reversion bzw. Transition in einen anderen Polarisationsstatus erfolgen kann (Abb. 4B) [126, 127]. In Abb. 4C sind die Merkmale der einzelnen Subtypen dargestellt. M1-Makrophagen sekretieren vor allem pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-1 β oder TNF- α , produzieren ROS, weisen eine hohe Phagozytose-Aktivität auf und exprimieren verstärkt Moleküle zur Antigenpräsentation (MHC-Klasse-II) und T-Zell-Kostimulation (CD80) [123, 128–130]. M2a-Makrophagen, welche mit IL-4 oder IL-13 polarisiert werden können, werden als Geweberegeneration-fördernd betrachtet. Sie exprimieren beispielsweise Wachstumsfaktoren (VEGF-A, PDGF), Metalloproteinasen (MMP1, MMP12), anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β), produzieren EZM-Komponenten und können Fibroblasten stimulieren [82, 124, 131].

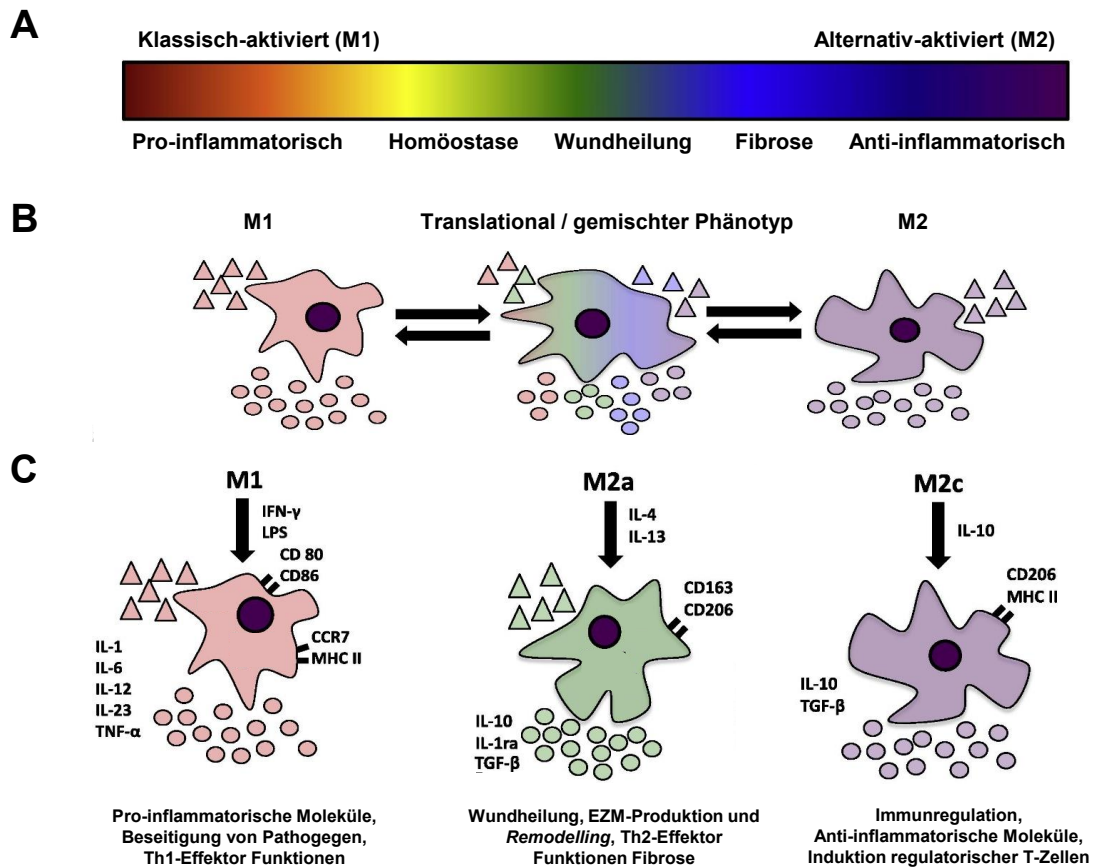


Abbildung 4: Paradigma der Makrophagen-Polarisation

A) Die Polarisation von Makrophagen findet in einem kontinuierlichen Spektrum statt mit den klassisch aktivierten M1-Makrophagen und alternativ aktivierten M2-Makrophagen als Extrema. B) Der Phänotyp von Makrophagen ist, abhängig von den Umgebungsfaktoren veränderlich. Außerdem können Zellen auch einen gemischten Phänotyp annehmen. C) Vereinfachte Übersicht der Induktoren, charakteristischer Oberflächenmoleküle und sezernierter Zytokinen/Chemokine von M1, M2a und M2c Makrophagen (Abbildung modifiziert nach Brown *et al.*, 2013 [126]).

Dadurch werden M2a-Makrophagen aber auch als pro-fibrotischer Phänotyp angesehen [132, 133], denn stimulierte Fibroblasten synthetisieren vermehrt Kollagen, welches in großen Mengen abgelagert wird und somit zur Einkapselung des Materials bzw. zur Fibrose des Gewebes führt [134–136]. M2c-Makrophagen werden durch IL-10 oder TGF- β induziert und besitzen immunmodulatorische bzw. -supprimierende Eigenschaften [130, 137]. Weiterhin sind M2c-Makrophagen weitaus potenter als M2a-Makrophagen in der Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) [138, 139].

T-Zellen Die Implantation von allogenem Gewebe führt über die Erkennung von Fremdantigenen durch T-Zellen zu deren Aktivierung und Einleitung der adaptiven Immunantwort. Die T-Zellaktivierung ist dabei von drei Faktoren abhängig: (1) der Erkennung des

Fremdantigens, welches durch den MHC-Komplex präsentiert wird oder von der direkten Erkennung des fremden Spender-MHC-Komplexes durch den T-Zellrezeptor, (2) der Bindung kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80), welche von Antigen-präsentierenden Zellen (engl.: *Antigen Presenting Cells*, APCs), wie Makrophagen und DCs, exprimiert werden und (3) einem Zytokinmilieu, welches die T-Zellproliferation begünstigt [140]. MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-ABC) befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und werden von CD8⁺ T-Zellen erkannt. CD4⁺ T-Zellen binden an MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR), welche vor allem von APCs, aber beispielsweise auch von Endothelzellen und in geringem Maß von glatten Muskelzellen exprimiert werden [16]. Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen exprimieren ebenfalls verschiedene kostimulatorische Moleküle, jedoch nicht CD80 [141]. Dennoch sind Endothelzellen, aber nicht glatte Muskelzellen, in der Lage, die Proliferation allogener CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren [141]. Zhang *et al.* fanden heraus, dass den glatten Muskelzellen im Gegensatz zu Endothelzellen die Moleküle OX40-Ligand (OX40-L) und der induzierbare Kostimulator-Ligand (engl.: *Inducible Costimulator Ligand*, ICOS-L) fehlen, um die Zytokinproduktion und Proliferation von T-Zellen zu aktivieren [142].

T-Zellen sezernieren im Gewebe eine Reihe von Faktoren, welche sowohl fördernde als auch inhibierende Funktionen auf die Geweberegeneration haben. So zeigen Studien beispielsweise, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die Regeneration von Knochengewebe hemmen [143, 144]. CD4⁺ T_{reg} sind wiederum auch nötig für die Knochenregeneration, da T_{reg} anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β 1 freisetzen, was die Polarisierung zum M2-Makropagen-Phänotyp bewirkt [144, 145]. Auch im Kontext von kardiovaskulären Geweben zeigen Studien, dass die Anwesenheit von T_{reg} eine wichtige Rolle in der Modulation der Immunantwort spielt [146]. So wurde beispielsweise festgestellt, dass T_{reg} die Heilung und Regeneration nach einem myokardialen Infarkt im Mausmodell verbessern [147]. Außerdem wurde bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine verminderte Anzahl von T_{reg} festgestellt [148, 149].

2 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Reaktion des humanen Immunsystems auf allogene kardiovaskuläre Gewebe nach unterschiedlichen Konservierungsmethoden mittels geeigneter *In-vitro*-Testsysteme zu charakterisieren. Hierbei lag der Fokus vor allem auf dem Vergleich der beiden Einfrierverfahren, konventionelle Kryokonservierung (CFC) und eisfreie Kryokonservierung (IFC), welche in einigen Aspekten der chemischen Konservierung mittels Glutaraldehyd (GA) gegenübergestellt wurden. Humanes Aortengewebe diente bei allen Untersuchungen als Modell für kardiovaskuläres Gewebe.

Um die Immunogenität des Aortengewebes nach einer Konservierung beurteilen zu können, wurden zwei aufeinander aufbauende Fragestellungen bearbeitet.

1. Durch welche Charakteristika zeichnen sich kardiovaskuläre Gewebe nach CFC, IFC und GA-Fixierung hinsichtlich Struktur und Metabolismus aus?

Hierzu fanden zum einen histologische Analysen der Extrazellulären-Matrix-Struktur, der Anwesenheit gewebespezifischer Zelltypen sowie der Nachweis immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle statt. Zum anderen erfolgten Untersuchungen zur Vitalität der Gewebezellen und die Bestimmung der vom Gewebe freigesetzten löslichen Faktoren.

2. Wird die Reaktion des Immunsystems auf kardiovaskuläre Gewebe durch CFC, IFC und GA-Fixierung beeinflusst?

Wichtige Aspekte im Ablauf einer Immunantwort wurden durch funktionelle Untersuchungen *in vitro* analysiert. Insbesondere wurde dabei die Aktivierung des Komplementsystems, das Migrationsverhalten von Immunzellen sowie die Aktivierung von Polymorphkernigen Leukozyten (PMNs), Monozyten, Makrophagen und T-Zellen einer genaueren Betrachtung unterzogen. Dabei wurden für die optimale Analyse der PMNs und Makrophagen spezielle Immunzell-Gewebe-Kokultur-Assays entwickelt.

3 Material und Methoden

In den folgenden Material- und Methodenbeschreibungen werden die im Labor gebräuchlichen englischen Begriffe verwendet:

- *Well* (Kavität / Vertiefung)
- *Wellplatte* (Mikrotiterplatte)
- *Assay* (standardisierter Versuchsablauf / Experiment)

3.1 Materialien

3.1.1 Humane primäre Zellen und Gewebe

Humane Immunzellen (PBMCs und PMNs)

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) und Polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten) (engl.: *Polymorphonuclear Leukocytes*, PMNs) wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden und Probandinnen mit deren Einverständnis und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin gewonnen:

- *Buffy Coats* (Blutkonserven), Deutsches Rotes Kreuz (*Ethikvotum EA1/226/14*)
- Frischblut, freiwillige Spender und Spenderinnen (*Ethikvotum EA2/139/10*)

Humanes Aortengewebe

Humanes Aortengewebe wurde während Operationen am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) in Kooperation mit Prof. Dr. med. Christof Stamm entnommen. Die Gewebeentnahme wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (*Ethikvotum EA4/028/12*) und erfolgte mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten und Patientinnen. Bei den Patienten und Patientinnen lag üblicherweise die Diagnose eines Aneurysmas vor, wodurch die Gefahr einer Dissektion oder Ruptur der Aortenwand bestand.

Bei der Operation von Aortenaneurysmen wird der betroffene Abschnitt der Aorta entfernt und durch eine Prothese ersetzt. Das entnommene Aortengewebe wurde bis zur Weiterverarbeitung (siehe Abschnitt 3.2) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl.: *Phosphate Buffered Saline*, PBS) bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Gebrauchsfertige Lösungen, Medien und Kits

Tabelle 1: Verwendete gebrauchsfertige Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
Accutase [®] StemPro [®] , Gibco [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Antibiotika-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 12)	Labor U. A. Stock, Goethe-Universität Frankfurt/Main (D)
Aquatex [®]	Merck, Darmstadt (D)
Biocoll-Separationslösung	Biochrom/Merck, Darmstadt (D)
Chromogene Substratösung-AEC	Dako/Agilent, Santa Clara (USA)
Descosept [®]	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld (D)
DNase-I-Puffer (aus Nucleospin RNA Kit)	Macherey-Nagel, Düren (D)
Entellan [®]	Merck, Darmstadt (D)
Eosin-Y-Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Biolegend, San Diego (USA)
Fix/Perm-Puffer (aus Foxp3-Transcription Factor Staining Buffer Set), eBioscience [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
H ₂ O ₂ -Blocklösung	Dako/Agilent, Santa Clara (USA)
Hämatoxylin-Lösung, Harris, modifiziert	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
PBS, ohne Mg ₂ ⁺ Ca ₂ ⁺	Biochrom/Merck, Darmstadt (D)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen/Strep), 100x, Gibco [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Perm-Puffer (aus Foxp3-Transcription Factor Staining Buffer Set), eBioscience [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Polymorphprep [™]	Alere Technologies AS, Oslo (NOR)
Sterilium [®]	Bode Chemie, Hamburg (D)
Streptavidin-HRP-Lösung	Dako/Agilent, Santa Clara (USA)
Tissue-Tek [®]	Leica, Nussloch (D)
Trypsin, 0,5 % (Trypsin-EDTA-Lösung, 10x), Gibco [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 2: Verwendete Medien.

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (3,7 g/L NaHCO ₃ , 4,5 g/L D-Glukose, ohne L-Glutamin)	Biochrom/Merck, Darmstadt (D)
Very Low Endotoxin (VLE) - Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Biochrom/Merck, Darmstadt (D)

Tabelle 3: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Pierce TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega, Madison (USA)
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Madison (USA)
CFSE Cell Division Tracker Kit	Biolegend, San Diego (USA)
CytoTox-ONE TM Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Madison (USA)
DeadEnd TM Colorimetric TUNEL System	Promega, Madison (USA)
EndoZyme [®] II	Hyglos, Bernried am Starnberger See (D)
Foxp3-Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Hemacolor [®] Rapid Stain	Merk, Darmstadt (D)
IL-10 ELISA Kit, human, Max TM Deluxe	Biolegend, San Diego (USA)
IL-6 ELISA Kit, human, Max TM Deluxe	Biolegend, San Diego (USA)
MCP-1 ELISA Kit, human, Max TM Deluxe	Biolegend, San Diego (USA)
LEGENDplex TM , Human Inflammation Panel	Biolegend, San Diego (USA)
Live/Dead [®] Fixable Stain Kit (V510), Invitrogen TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Nucleospin RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren (D)
TNF- α ELISA Kit, human, Max TM Deluxe	Biolegend, San Diego (USA)
Total TGF- β 1 ELISA Kit, LEGEND Max TM mit vorbeschichteten Platten	Biolegend, San Diego (USA)

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Seren und Proteine.

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA), 7,5 %-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DNase-I (aus Nucleospin RNA Kit)	Macherey-Nagel, Düren (D)
Esel-Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Fetales Kälberserum (FCS), HighClone™	GE Healthcare Lifescience (USA)
Humanes Serum der Blutgruppe AB (AB-Serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Humanes Serumalbumin (HSA), 200 g/L - Infusionslösung	Baxalta (Shire), Unterschleißheim (D)
L-Glutamin, 200 mM, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Proteinase K (aus DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System)	Promega, Madison (USA)

Tabelle 5: Verwendete Zytokine und Reagenzien für die Immunzellkultur.

Bezeichnung	Hersteller
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
CD3 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Fc-Rezeptorblock	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
IFN γ , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
IL-10, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
IL-4, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
IL-6, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
IL-8, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Lipopolysaccharid (LPS), Escherichia coli 0127:B8	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
MCP-1, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
M-CSF, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
TNF- α , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
1,2-Propandiol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
1-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe (D)
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), Molekulare Probes TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO), für CFC/IFC-Lösung, ACROS Organics TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO), Zellkultur-getestet, für Einfriermedium	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Endotoxin-freies Wasser, Ampuwa [®]	Fresenius, Bad Homburg (D)
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol, reinst	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Formamid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glutaraldehyd (GA), Grad II, 70 %	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
HEPES Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Salpetersäure, 2N	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Schwefelsäure, 2N	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merk, Darmstadt (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

3.1.4 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete humanspezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper (alle *Maus*, *anti-human*) für die Durchflusszytometrie und ihre eingesetzte Verdünnung (Verd.).

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verd.
CD11b-Alexa 488	ICRF44	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:100
CD14-APCC7	M ϕ P9	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:100
CD14-PerCPCy5.5	M5E2	Biolegend, San Diego (USA)	1:50
CD14-V450	M ϕ P9	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:50
CD15-FITC	VIMC6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)	1:50
CD163-FITC	GHI/61	Biolegend, San Diego (USA)	1:20
CD16b-VioBlue	REA589	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)	1:200
CD16-PerCP5.5	3G8	Biolegend, San Diego (USA)	1:200
CD206-APC	15-2	Biolegend, San Diego (USA)	1:100
CD25-PE	BC96	Biolegend, San Diego (USA)	1:100
CD3-PerCPCy5.5	SK7	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:50
CD43-PECy7	CD43-10G7	Biolegend, San Diego (USA)	1:1000
CD4-APC	OKT4	Biolegend, San Diego (USA)	1:50
CD4-PerCPCy5.5	SK3	Biolegend, San Diego (USA)	1:75
CD62L-APCCY7	DREG-56	Biolegend, San Diego (USA)	1:20
CD63-PE	H5C6	Biolegend, San Diego (USA)	1:20
CD66b-PerCP5.5	G10F5	Biolegend, San Diego (USA)	1:200
CD80-PE	2D10	Biolegend, San Diego (USA)	1:20
CD8-PE	BW135/80	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)	1:100
CTLA4	BNI3	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:20
FoxP3	259D/C7	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:10
HLA-DR-PECy7	L243	Biolegend, San Diego (USA)	1:400

Tabelle 8: Verwendete humanspezifische unkonjugierte Antikörper (alle *Maus*, *anti-human*) für funktionelle Assays und ihre eingesetzte Verdünnung (Verd.).

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verd.
α CD28	CD28.2	BD Bioscience, San Jose (USA)	1:3000
α CD3	OKT3	Janssen-Cilag, Neuss (D)	1:6000 bzw. 1:80000
α TGF β 1,2,3	1D11	R&D Systems, Minneapolis (USA)	1:50

Tabelle 9: Verwendete humanspezifische unkonjugierte oder biotinylierte Antikörper für die Histologie und ihre eingesetzte Verdünnung (Verd.).

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verd.
C4-unkonjugiert (<i>Ziege, anti-human</i>)	Polyklonal	Abcam, Cambridge (UK)	1:200
CD31-unkonjugiert (<i>Maus, anti-human</i>)	WM-59	eBioscience TM , Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	1:50
HLA-DR-unkonjugiert (<i>Maus, anti-human</i>)	TAL.1B5	Dako/Agilent, Santa Clara (USA)	1:50
IgG-biotinyliert (<i>Maus, anti-human</i>)	JDC-10	SouthernBiotech, Birmingham (USA)	1:100

Tabelle 10: Verwendete sekundäre Antikörper für die Histologie und ihre eingesetzte Verdünnung (Verd.).

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Verd.
Alexa Fluor 555 (<i>Esel, anti-maus</i>)	Polyklonal	Invitrogen TM , Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	1:100
Alexa Fluor 647 (<i>Esel, anti-ziege</i>)	Polyklonal	Invitrogen TM , Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	1:100

3.1.5 Angesetzte Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer

Tabelle 11: Angesetzte Zellkulturmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Zellkulturmedium	RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep (100x) und 1 % Glutamin, sterilfiltriert (0,22 µm Filter)
Diätmedium	RPMI mit 1 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep (100x) und 1 % Glutamin, sterilfiltriert (0,22 µm Filter)

Tabelle 12: Angesetzte Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Aggregiertes humanes IgG	10 mg IgG in 1 mL PBS
Antibiotika-Medium	2 mL Antibiotika-Mix (15 mg/L Amikacin, 37,5 mg/L Flucytosin, 15 mg/L Vancomycin, 3,75 mg/L Ciprofloxacin, 15 mg/L Metronidazol) in 500 mL DMEM Hergestellt von Maryam Tabib (Labor U. A. Stock, Frankfurt/Main)
Blocklösung	PBS mit 1 % BSA und 5 % Esel-Serum
CFC-Einfriermedium	50 mL DMSO + 50 mL HSA + 400 mL DMEM
DNase-I-Lösung	DNase-I-Puffer mit 10 % DNase-I
Einfriermedium für Zellen	FCS mit 10 % DMSO (Zellkultur-getestet)
Euro-Collins-Lösung (EC-Lösung) (5x)	174,76 g D-(+)-Glukose + 10,2 g KH_2PO_4 + 36,5 g K_2HPO_4 + 5,6 g KCl + 4,2 g NaHCO_3 , <i>ad</i> 1000 mL <i>Aqua dest.</i> , pH-Wert auf 7,4 einstellen, sterilfiltriert (0,22 µm Filter)
Euro-Collins-Lösung (1x)	100 mL EC-Lösung (5x) + 400 mL <i>Aqua dest.</i>
FACS-Puffer	PBS mit 1 % FCS und 0,1 % NaN_3
PFA-Fixierungslösung (1 %) für FACS	1 Teil PFA-Lösung (4 %) + 3 Teile FACS Puffer
PFA-Lösung (2 %) für Histol.	2 Teile PFA-Lösung (4 %) + 2 Teile PBS
Glutaraldehyd (GA)-Lösung (2,5 %) für REM	1,78 mL GA (70%) in 50 mL PBS

Bezeichnung	Zusammensetzung
Glutaraldehyd (GA)-Lösung (0,2 %) für GA-Fixierung	142 µL GA (70%) in 50 mL PBS, sterilfiltriert (0,22 µm Filter)
MACS-Puffer	PBS mit 2 mmol/L EDTA und 1 % FCS
Mannitol-Lösung (0,5 mol/L bzw. 0,25 mol/L)	45,54 g bzw. 22,77 g D-Mannitol in 500 mL DMEM
NaCl-Lösung (0,85 %)	8 g NaCl in 940 mL <i>Aqua dest.</i>
NaCl-Lösung (1,5 mol/L)	87,66 g NaCl <i>ad</i> 1000 mL <i>Aqua dest.</i>
PFA-Lösung (4 %)	0,4 g Paraformaldehyd in 500 µL <i>Aqua dest.</i> + 25 µL NaOH (1N) + 9,5 mL PBS
Proteinase-K-Lösung	PBS mit 20 µg/mL Proteinase K
TBS/Tween	1 mL Tween® 20 in 1000 mL TBS
Tris-HCL-Puffer	60,55 g TRIS in 900 mL <i>Aqua dest.</i> , pH-Wert auf 7,6 einstellen (mit HCl), <i>ad</i> 1000 mL <i>Aqua dest.</i>
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	100 mL Tris-HCL-Puffer + 100 ml NaCl-Lösung (1,5 mol/L), <i>ad</i> 1000 mL <i>Aqua dest.</i> , pH-Wert 7,6
VS83 (IFC-Lösung)	100 mL EC-Lösung (5x) + 1,19 g HEPES + 126,28 g 1,2-Propandiol + 104,57 g Formamid + 181,60 g DMSO, <i>ad</i> 500 mL <i>Aqua dest.</i> , pH-Wert auf 7,9 - 8,1 einstellen, sterilfiltriert (0,22 µm Filter)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Verwendete Materialien zur Blutabnahme.

Bezeichnung	Hersteller
Einmalkanülen, Safety-Lok TM , Vacutainer [®]	BD, Heidelberg (D)
K ₂ EDTA-Röhrchen, Vacutainer [®]	BD, Heidelberg (D)
Na ₃ -Citrat-Röhrchen, Vacutainer [®]	BD, Heidelberg (D)
Softasept [®] N	Braun, Melsungen (D)

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Biopsiestanze – 8 mm	pfm medical AG, Köln (D)
Chemotaxissystem <i>ChemoTX</i> [®] – 3 µm Porengröße	Neuro Probe, Gaithersburg (USA)
Combitips advanced [®]	Eppendorf, Hamburg (D)
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen (D)
Flachboden-Zellkulturplatten – 48-Well, Cellstar [®]	Greiner Bio-One, Kremsmünster (A)
Flachboden-Zellkulturplatten – 6/24/48/96-Well, Costar [®]	Corning Inc., Corning (USA)
Flachboden-Zellkulturplatten – schwarz – 96-Well, Nucleon TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Flachboden-Zellkulturplatten – weiß – 96-Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster (A)
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Assistent, Sondheim v. d. Rhön (D)
Konische Zentrifugenröhrchen – 15/50 mL, Falcon TM	Corning Inc., Corning (USA)
Kryoröhrchen – 1,8 mL	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Leit-Tab (Klebeplättchen für REM)	Plano, Wetzlar (D)
Low-Binding Reagiergefäße – 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht (D)
MACS [®] LS-Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
MaxiSorp TM ELISA Platten, unbeschichtet	Biolegend, San Diego (USA)
Mr. Frosty TM Gefrierbehälter, Nalgene [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Objektträger, SuperFrost [®]	Langenbrinck, Emmendingen (D)
Pipetten-Spitzen	Eppendorf, Hamburg (D)

Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße, Safe-Lock™	Eppendorf, Hamburg (D)
Rundboden-Röhrchen – 5 mL, Falcon®	Corning Inc., Corning (USA)
Rundboden-Röhrchen – 1,4 mL, Micronics	Micronic, Lelystad (NL)
Serologische Pipetten, Falcon®	Corning Inc., Corning (USA)
Silikonschlauch (für Fixierungsringe) – iØ = 6,4 mm; aØ = 11,2 mm	Ismatec/Cole-Parmer, Wertheim (D)
Skalpell, Feather®	pfm medical AG, Köln (D)
Spritzen	Braun, Melsungen (D)
Sterilfilter – 0,22 µm, Steriflip®, Stericup®	Merck, Darmstadt (D)
Stiftprobenhalter für REM	Plano, Wetzlar (D)
Transferpipetten – 6 mL	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Vorfilteraufsatz – 30 µm Poren, CellTrics®	Sysmex, Norderstedt (D)
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht (D)

3.1.7 Software und Geräte

Tabelle 15: Verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Axio Vision Release (Version 4.7.2)	Carl Zeiss, Jena (D)
Columbus™ Image Data Storage	Perkin Elmer, Waltham (USA)
DeltaT (Version 6)	Planer PLC, Middlesex (UK)
FACS Diva Software	BD Bioscience, San Jose (USA)
FCAP Array (Version 3)	BD Bioscience, San Jose (USA)
Fiji-ImageJ	Open Source [150]
FlowJo (Version 7 und 10)	TreeStar Inc., Ashland (USA)
GraphPad Prism™ (Version 5.03)	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Harmony® Imaging and Analysis	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Magellan™ (Version 6)	Tecan, Männedorf (CH)
Mendeley Reference Manager	Elsevier/RELX Group, London (UK)
Microplate Manager (Version 5.2)	Bio-Rad, München (D)
MS® Office 2016	Microsoft, Redmond (USA)
SoftMax® Pro (Version 5.2)	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)

Tabelle 16: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Aspirationssystem (VacuSafe)	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Biosafe® (Stickstofftank)	Cryotherm , Kirchen/Sieg (D)
CASY™ Cell Counter	OLS OMNI Life Science, Bremen (D)
Durchflusszytometer (FACSCanto II)	BD Bioscience, San Jose (USA)
Durchlichtmikroskop (DMi8)	Leica, Wetzlar (D)
Durchlichtmikroskop (Zeiss-Axio Scope)	Zeiss, Jena (D)
Einfrierautomat (Kryo 560)	Planer PLC, Middlesex (UK)
Elektronische 8-Kanal-Pipette, Xplorer®	Eppendorf, Hamburg (D)
Elektronischer Multistepper, Xplorer®	Eppendorf, Hamburg (D)
Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1)	Zeiss, Jena (D)
Gefrierschrank -80°C	Dometic, Emsdetten (D)
Inkubator - Innova®-CO-170	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Kryostat (CM3050 S)	Leica, Wetzlar (D)
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
MiniSpin® Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg (D)
Operetta® High Content Imaging System	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Plattenlesegerät (Infinite 200 PRO)	Tecan, Männedorf (CH)
Plattenlesegerät (Mithras LB 940)	Berthold Technologies, Bad Wildbach (D)
Plattenlesegerät (SprectraMax 340PC)	Molecular Decvices, Sunnyvale (USA)
Rasterelektronenmikroskop (JCM 6000 Benchtop)	JEOL, Freising (D)
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Überkopfschüttler	VWR, Darmstadt (D)
Vakuum-Fine-Coater (JFC-1200)	JEOL, Freising (D)
Waage XR 205SM-DR	Precisa Gravimetrics, Dietikon (CH)
Wasserbad	Gesells. für Labortechnik, Burgwedel (D)
Zentrifuge Allegra® X-15R	Beckman Coulter, Brea (USA)
Zentrifuge Allegra® X-22R	Beckman Coulter, Brea (USA)

3.2 Konservierungsmethoden

Humanes Aortengewebe wurde während Operationen am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) unter sterilen Bedingungen entnommen (siehe Abschnitt 3.1.1).

Nach der Entnahme wurde das Aortengewebe zweimal für 5 min auf einem Überkopfschüttler in PBS gewaschen und anschließend für mindestens 24 h im Antibiotika-Medium bei 4 °C gelagert, um mögliche bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Nach der Antibiotikabehandlung wurden mittels einer Biopsiastanze 8 mm große Gewebestücke ausgestanzt. Diese wurden dann randomisiert einer der drei Konservierungsmethoden (Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.3) zugeordnet und dementsprechend weiterbehandelt.

3.2.1 Konventionelle Kryokonservierung

Bei der konventionellen Kryokonservierung (CFC) wurden die humanen Aortengewebestücke in jeweils 5 mL CFC-Einfriermedium (DMEM mit 10 % DMSO und 10 % humanes Serumalbumin (HSA)) 1 h schüttelnd auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gewebestück mit 1,8 mL CFC-Medium in ein Kryoröhrchen transferiert und im Einfrierautomaten (PLANNER Kryo 560) unter standardisierten Bedingungen mit einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Das genutzte Einfrierprotokoll zur Erreichung eines kontinuierlichen Temperaturabfalls in der Probe von 1 °C/min, ist Tabelle 17 zu entnehmen. Wichtig war hierbei, dass die am Kristallisationspunkt freigesetzte Wärme (Erstarrungswärme) nicht wieder zu einem starken Temperaturanstieg in der Probe führte. Aus diesem Grund ist eine kurzzeitige Temperaturerniedrigung in der Kammer des Einfrierautomaten von -4 °C auf -20 °C nötig, bevor die Abkühlrate durch einen Temperaturanstieg wieder bei -12 °C fortgesetzt wird.

Tabelle 17: Automatisches CFC-Einfrierprotokoll für humanes Aortengewebe. Die Temperaturangaben sind die Werte für die Kammer des Einfrierautomaten, um in der Probe eine Rate von 1 °C/min zu erreichen.

Schritt	Abkühlrate	Endtemperatur
1	1 °C/min	-4 °C
2	2 min Temperatur halten	-4 °C
3	5 °C/min	-20 °C
4	2 min Temperatur halten	-20 °C
5	10 °C/min	-12 °C
6	1 °C/min	-80 °C

Die Gewebestücke wurden mindestens einen Monat in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs bei ca. -160°C gelagert, bis sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Für spätere Versuche und immunologische Testungen wurden die CFC-Proben im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach erfolgten 3 Waschschrte: zunächst in 5 mL eiskalter 0,5 mol/L Mannitol-Lösung pro Gewebestücke, danach in 5 mL eiskalter 0,25 mol/L Mannitol-Lösung und abschließend in eiskaltem DMEM.

3.2.2 Eisfreie Kryokonservierung

Für die eisfreie Kryokonservierung (IFC) wurden die humanen Aortengewebestücke in jeweils 5 mL VS83 (Euro-Collins-Lösung mit 4,65 mol/L Formamid, 4,65 mol/L DMSO und 3,31 mol/L 1,2-Propandiol) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde das Gewebestück mit 1,8 mL VS83 in ein Kryoröhrchen transferiert und auf ca. -100°C gekühlt. Dies erfolgte in einem 2-Methylbutanbad, welches im flüssigen Stickstoff auf ca. -135°C vorgekühlt war. Die VS83-Lösung ist gefroren, wenn keine Flüssigkeitsbewegungen mehr im Kryoröhrchen zu verzeichnen sind. Die Proben wurden dann sofort auf Trockeneis transferiert und später im Gefrierschrank bei -80°C für mindestens einen Monat gelagert, bis sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Für spätere Versuche und immunologische Testungen wurden die IFC-Proben im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und fünfmal in jeweils 5 mL Euro-Collins-Lösung pro Gewebestücke bei RT gewaschen.

3.2.3 Fixierung mittels Glutaraldehyd

Für die Fixierung mittels Glutaraldehyd (GA) wurden die humanen Aortengewebestücke in jeweils 5 mL 0,2 % GA-Lösung 7 Tage bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Gewebestücke dreimal mit PBS für jeweils 5 min bei RT gewaschen. Bis zu ihrer Verwendung in weiteren Analysen wurden die Gewebestücke in PBS bei 4°C gelagert. Die GA-fixierten Proben wurden später noch zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in die entsprechenden Zellkulturmedien für Versuche und immunologische Testungen überführt wurden.

3.3 Methoden zur Gewebecharakterisierung

3.3.1 Untersuchungen zur Gewebevitalität

3.3.1.1 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität des Aortengewebes wurde mittels MTS-Test bestimmt. Der Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes zu einem violetten Produkt durch NADH und NADPH, welche von metabolisch aktiven Zellen gebildet werden. Für den Versuch wurde der *CellTiter 96[®]AQueous One Solution Assay* entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebestücke nach dem Auftau- und Waschprozess über Nacht in DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte). Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 200 µL neues DMEM und 40 µL *CellTiter 96[®]AQueous*-Reagenz hinzugegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Am Ende wurden 100 µL des Mediums abgenommen und in eine 96-Wellplatte transferiert (Duplikat). Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Plattenlesegerät (SpectraMax 340PC) gemessen. Die Absorption ist zum umgesetzten Farbstoff und damit zur metabolischen Aktivität proportional.

3.3.1.2 Detektion nekrotischer Zellen im Gewebe

Nekrotische Zellen und Zellen mit beschädigter Membran können anhand der Aktivität der freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt werden. Für den Versuch wurde der *CytoTox-ONE[™]Homogeneous Membrane Integrity Assay* verwendet und bei der Durchführung dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Dafür wurden CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebestücke nach dem Auftau- und Waschprozess für 90 min in 500 µL DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte). Danach wurden 100 µL konditioniertes Medium in eine schwarze 96-Wellplatte transferiert (Duplikat) und 100 µL *CytoTox-ONE[™]*-Reagenz hinzugegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm in einem Plattenlesegerät (Tecan-Infinite 200 PRO) gemessen. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur LDH-Aktivität.

3.3.1.3 Detektion apoptotischer Zellen im Gewebe

Caspase Assay Apoptotische Zellen im Gewebe können anhand der Aktivität der Enzyme Caspase-3 und -7 bestimmt werden. Für den Versuch wurde der *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay verwendet und bei der Durchführung dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Dafür wurden CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebestücke nach dem Auftau- und Waschprozess für 90 min in 500 µL DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte). Danach wurden 100 µL konditioniertes Medium in eine weiße 96-Wellplatte transferiert (Duplikat) und 100 µL *Caspase-Glo*[®] 3/7-Reagenz hinzugegeben, gut gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz in einem Plattenlesegerät (Mithras LB 940) gemessen. Die Lumineszenz ist proportional zur Caspase-Aktivität.

TUNEL-Assay Weiterhin wurden apoptotische Zellen in den Gewebeschnitten mittels TUNEL-Färbung bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.4.3, Seite 37).

3.3.2 Herstellung von konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium (KM) ist das Kulturmedium, welches mit löslichen Faktoren aus humanem Aortengewebe bzw. von Immunzellen angereichert wurde und entsprechend generiert wurde:

- CFC-, IFC- und GA-fixierte 8 mm große Aortengewebestücke wurden nach dem Auftau- und Waschprozess in 800 µL Medium (je nach Experiment in Diätmedium, RPMI oder DMEM) bei 37 °C und 5 % CO₂ (je nach Experiment für 1, 2 oder 6 Tage) inkubiert.
- PMNs und Makrophagen wurden wie unter Abschnitt 3.5.3.2 beschrieben in Zellkulturmedium kultiviert.
- 1×10^6 PBMCs wurden in 2 mL Zellkulturmedium in einer 24-Wellplatte mit 0,5 µg/mL α CD3 und 1 µg/mL α CD28 stimuliert und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 6 Tage kultiviert.

Der Überstand der Aortengewebe-, Makrophagen- oder PBMC-Kultur wurde anschließend abgenommen und nochmals für 1 min mit $1000 \times g$ zentrifugiert, um mögliche Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Das so erhaltene KM wurde bis zur weiteren Verwendung in funktionellen Tests bzw. bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der Zytokinfreisetzung

3.3.3.1 Multiplex-Assay

Die Zytokinbestimmung erfolgte im KM einer eintägigen Kultur CFC-, IFC- oder GA-fixierter Aortengewebestücke in DMEM (siehe Abschnitt 3.3.2). In den Proben wurde mittels des Bead-basierten Assays *LEGENDplex™ (human Inflammation Panel)* die Konzentration folgender Zytokine bestimmt: MCP-1 (CCL2), IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, TNF- α . Der Assay wurde von Meaghan Stolk den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Messung erfolgte am *BD FACSCanto II* und zur Analyse wurde die Software *FCAP Array* Version 3 verwendet.

3.3.3.2 ELISA

Standard-Protokoll Die Zytokinbestimmung mittels Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) erfolgte im KM der Kulturen von CFC-, IFC- oder GA-fixierter Aortengewebestücke in DMEM und von PMNs sowie Makrophagen in Zellkulturmedium (siehe Abschnitt 3.3.2). In den Proben wurde mittels verschiedener *ELISA-MAX™* Kits die Konzentration folgender Zytokine bestimmt: MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 und TNF- α . Die Bestimmung von Mip1- β erfolgte mit dem Kit *ELISA Ready-SET-Go!™*. Die Durchführung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm in einem Plattenlesegerät (SpectraMax 340PC) gemessen.

Aktives und Gesamt-TGF- β 1 Bei der Bestimmung der TGF- β 1-Konzentration im KM von Aortengewebe wurde zum einen das aktive und zum anderen das Gesamt-TGF- β 1 bestimmt. TGF- β 1 kommt sowohl in einer freien, biologisch aktiven Form als auch in einer an das *Latency-associated Protein* (LAP) gebundenen, inaktiven Form vor. Die Menge des Gesamt-TGF- β 1 ist die Summe der Menge des aktiven TGF- β 1 und der Menge des inaktiven TGF- β 1. Um das Gesamt-TGF- β 1 zu bestimmen, müssen die Proben angesäuert werden, um dadurch das TGF- β 1 zu aktivieren – es wird also LAP-gebundenes, inaktives TGF- β 1 komplett in die aktive Form überführt und kann somit im ELISA detektiert werden. Die Ansäuerung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend (mit *Acidification Solution* und anschließend *Neutralization Solution*) vor dem Auftragen der Proben. Für die Bestimmung des aktiven TGF- β 1 wurden die Proben ohne Ansäuerungsschritt direkt aufgetragen und danach dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Anstelle des Ansäuerungsschrittes wurden KM vom CFC-Gewebe (CFC-KM) mit Komponenten der IFC- und CFC-Einfriermedien inkubiert: Mit 25 % 1,2-Propandiol, 21 % Formamid und 36 % DMSO, entsprechend ihrem Anteil in der IFC-Lösung VS83 bzw. mit 10 % DMSO, entsprechend dem Anteil im CFC-Medium (Pipettierschema siehe Tabelle 18). Nach 10 min Inkubation erfolgte wieder die Neutralisierung (*Neutralization Solution*) bevor die Proben für den ELISA aufgetragen wurden.

Tabelle 18: Pipettierschema für die Behandlung des konditionierten Mediums vom CFC-Gewebe (CFC-KM) mit Komponenten der IFC- und CFC-Einfriermedien zur Aktivierung des TGF- β für den ELISAs.

Behandlung	CFC-KM	+	Komponente Einfriermedium
Ansäuerung (Standard)	40,0 μ L CFC-KM	+	10,0 μ L Acidification Solution
25 % 1,2-Propandiol (IFC)	37,4 μ L CFC-KM	+	12,6 μ L 1,2-Propandiol
21 % Formamid (IFC)	39,5 μ L CFC-KM	+	10,5 μ L Formamid
36 % DMSO (IFC)	31,8 μ L CFC-KM	+	18,2 μ L DMSO
10 % DMSO (CFC)	45,0 μ L CFC-KM	+	5,0 μ L DMSO

Kinetik der Zytokinproduktion Außerdem wurde die Kinetik der Freisetzung von IL-6, MCP-1 und TGF- β 1 in das KM bestimmt. Dazu wurden die Gewebestücke in 2500 μ L DMEM über 6 Tage inkubiert. Jeden Tag wurden jeweils 320 μ L KM aus demselben Well abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Da sich durch die tägliche Entnahme des Mediums das Gesamtvolumen verringerte, erfolgte nach der Bestimmung der Zytokin-konzentration per ELISA eine Rückrechnung auf die absolute Zytokinmenge.

$$\text{Zytokinmenge produziert pro Gewebestück [pg]} = \frac{\text{Zytokinkonzentration [pg/mL]}}{\text{Verbleibendes Volumen am Tag X [mL]}}$$

3.3.4 Histologische Methoden

3.3.4.1 Herstellung von Kryo-Gewebeschnitten

Die CFC-, IFC- und GA-fixierten Aortengewebestücke wurden nach dem Auftau- und Waschprozess zunächst über Nacht in Zellkulturmedium inkubiert und anschließend in 2 % PFA-Lösung für 10 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Gewebestücke in Einbettsschalen in *TissueTek*[®] eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kryoblöcke wurden bis zur Anfertigung der Gewebeschnitte bei -80 °C gelagert. Am Kryostat wurden später 6 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

Die Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C, in Aluminiumfolie eingepackt, gelagert.

3.3.4.2 H&E-Färbung

Die Kryo-Gewebeschnitte wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend für 4 min mit Hämatoxylin gefärbt. Danach wurden sie mit *Aqua dest.* gewaschen und für 1-2 min mit Eosin gefärbt. Die Schnitte wurden abschließend noch zweimal mit *Aqua dest.* gespült und mit Entellan[®] eingedeckt. Die so behandelten Gewebeschnitte lagerten bei RT. Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Zeiss-Axio Scope).

3.3.4.3 TUNEL-Färbung

Für den Nachweis apoptotischer Zellen in Gewebeschnitten von CFC-, IFC- und GA-fixierter humaner Aorta wurde eine *TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling* (TUNEL)-Färbung mit Hilfe des Kits *DeadEnd™Colorimetric TUNEL System* zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen durchgeführt. Die Färbung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend bei RT. Die Kryo-Gewebeschnitte wurden zunächst in 0,85 % NaCl und dann in PBS für jeweils 5 min gespült, bevor sie 15 min mit 4 % PFA fixiert wurden. Nach zweimaligem Spülen mit PBS für 5 min wurden die Gewebeschnitte zur Permeabilisierung mit 20 µg/mL Proteinase-K-Lösung 2 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen und erneut mit 4 % PFA 5 min fixiert.

Als Positivkontrolle wurden die Gewebeschnitte mit DNase behandelt, um DNA-Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Dazu wurden die Schnitte für die Positivkontrolle zunächst mit DNase-I-Puffer 5 min equilibriert und anschließend mit einer 10 % DNase-I-Lösung für 10 min inkubiert. Die Positivkontrolle wurde noch dreimal in *Aqua dest.* und einmal in PBS jeweils 5 min gewaschen, bevor sie wie die restlichen Gewebeschnitte weiter behandelt wurde. Alle Gewebeschnitte wurden nachfolgend für 5 min mit *TUNEL*-Equilibrierungs-Puffer inkubiert und mit dem Mix aus biotinylierten Nukleotiden und dem Enzym Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) 1 h bei 37 °C in einer befeuchteten Umgebung inkubiert. Abdeckplättchen auf den Schnitten verhinderten dabei die Austrocknung. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Schnitte in Natriumcitrat-Puffer 15 min und in PBS 5 min inkubiert wurden. Durch die Behandlung mit einer 0,3 % Wasserstoffperoxid-Lösung wurden die endogenen Peroxidasen geblockt. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurden die Gewebeschnitte mit Streptavidin-*Horseradish Peroxidase* (HRP)-Lösung 30 min

inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurde das chromogene Substrat hinzugegeben und im Dunkeln 9 min inkubiert. Nachdem die Substratlösung mit PBS abgewaschen wurde, erfolgte eine kurze Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 30 s. Dadurch wurden alle Zellkerne schwach blau gefärbt, jedoch war die Braunfärbung der Kerne mit DNA-Doppelstrangbrüchen ebenfalls noch zu erkennen. Die Gewebeschnitte wurden abschließend mit *Aquatex*[®] eingedeckt und bei RT gelagert. Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Leica-DMi8).

3.3.4.4 Immunhistochemischer Nachweis von IgG

Die Kryo-Gewebeschnitte wurden zweimal mit TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) für 5 min gewaschen und anschließend 10 min mit H₂O₂-Blocklösung bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS wurden die Schnitte 1 h bei RT in der Blocklösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper *Maus, anti-human IgG* (in Blocklösung verdünnt) bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Gewebeschnitte zweimal je 5 min mit TBS/Tween gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte 30 min mit Streptavidin-HRP (verdünnt in TBS) bei RT. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit TBS wurden die Gewebeschnitte 6 min mit der chromogenen Substratlösung 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) inkubiert. Abschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin für 4 min. Die Gewebeschnitte wurden dann noch zweimal mit TBS und zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen, bevor sie mit *Aquatex*[®] eingedeckt wurden. Die so behandelten Gewebeschnitte wurden bei RT gelagert. Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Zeiss-Axio Scope).

3.3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Kryo-Gewebeschnitte wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Blocklösung bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Antikörper in Blocklösung verdünnt) bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Gewebeschnitte dreimal je 5 min mit Blocklösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Antikörper in Blocklösung verdünnt) für 1,5 h bei RT. Die jeweiligen Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper ist der Tabelle 19 zu entnehmen. Alle Gewebeschnitte wurden dann nach zweimaligem Waschen mit PBS mit DAPI-Einbettmedium gegengefärbt und eingedeckt. Die so behandelten Schnitte wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle 19: Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.

Primärantikörper			Sekundärantikörper	
1	CD31	(Maus, anti-human)	AlexaFluor 555	(Esel, anti-maus)
2	HLA-DR	(Maus, anti-human)	AlexaFluor 555	(Esel, anti-maus)
3	C4	(Ziege, anti-human)	AlexaFluor 647	(Esel, anti-ziege)

Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte für die C4-Färbung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss-Axio Observer) und für die CD31- und HLA-DR-Färbung mit Hilfe des *Operetta High-Content-Imaging Systems* mit anschließender Analyse durch die Software *Columbus*TM.

3.3.5 Komplementaktivierungs-Assay

Als Indikator einer Aktivierung des Komplementsystems diene der Nachweis des Komplementfaktors C4, welcher im humanen Blutplasma als Zymogen vorliegt. Bei einer Aktivierung der Komplementkaskade wird dieser gespalten und lagert sich an der Gewebeoberfläche an.

Für den Assay erfolgte zunächst die Gewinnung humanen Plasmas aus frischem Blut (EDTA-Blut). Dazu wurde das Blut nach der Abnahme sofort auf Eis gestellt, bevor es mit $2000 \times g$ für 10 min zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde abgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert (maximal 4 h).

Die CFC-, IFC- und GA-fixierten Aortengewebestücke wurden am Tag zuvor aufgetaut bzw. gewaschen und über Nacht in PBS bei 4 °C gelagert. Für die Positivkontrolle erfolgte eine Inkubation mit 10 mg/mL aggregiertem humanem IgG in 1 mL PBS über Nacht bei 4 °C. Zur Aggregation wurde das humane IgG zuvor 20 min bei 65 °C im Wasserbad erhitzt. Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke noch zweimal mit PBS gewaschen, bevor der Assay durchgeführt wurde. Dann erfolgte die Inkubation der Gewebestücke mit 1 mL frischem humanem Plasma für 30 min schüttelnd bei 37 °C und 5 % CO₂. Bei entsprechender Aktivierung lagern sich die im Plasma befindlichen Komplementfaktoren an die Gewebeoberfläche an. Als Negativkontrolle wurden die Gewebe in PBS inkubiert. Die Gewebeproben wurden erneut mit PBS gewaschen, bevor sie in Schalen in *TissueTek*[®] eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Kryoblöcke wurden bis zur Anfertigung der Kryogewebeschnitte bei -80 °C gelagert.

Die histologische Analyse der C4-Anlagerung erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 3.3.4.5).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Isolation von Immunzellen

Blutentnahmen und Immunzellisolationen waren von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA1/226/14; EA2/139/10) und erfolgten von gesunden Probanden und Probandinnen mit deren Einverständnis.

3.4.1.1 PBMC-Isolation

Humane PBMCs wurden entweder aus *Buffy Coats* (Blutkonserven) oder frischem Blut (Citrat-Blut) isoliert. Dafür wurde das Blut mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt. 30 mL Blut wurden auf 15 mL Biocoll-Lösung geschichtet. Es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit $800 \times g$ für 30 min bei RT (ohne Bremse). Entsprechend ihrer Dichte ordnen sich die unterschiedlichen Fraktionen des Blutes im Reaktionsgefäß an: Erythrozyten und der Großteil der Granulozyten sedimentieren unter die Biocoll-Lösung; das Blutplasma und die Thrombozyten bilden die obere Phase des Gradienten. Zwischen der Biocoll-Lösung und der Blutplasmaphase bildet sich eine milchige Interphase aus. Diese Interphase besteht aus den mononukleären Zellen (PBMCs). Mit einer Pasteurpipette wurde die Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß, in dem eiskaltes PBS vorgelegt war, überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 mL eiskaltem PBS resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt.

3.4.1.2 Monozyten- und T-Zellseparation

Mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (engl.: *Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS®) wurden Monozyten (CD14⁺ Zellen) und T-Zellen (CD3⁺ Zellen) aus der PBMC-Fraktion isoliert. Dafür wurden die PBMCs eines *Buffy Coats* in 1 mL eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen und mit 250 µL magnetischen anti-CD14- bzw. anti-CD3-MACS-MicroBeads für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Bei PBMCs aus frischem Blut wurden entsprechend weniger Reagenzien eingesetzt, da aus frischem Blut in der Regel weniger PBMCs isoliert wurden. Hier wurden 80 µL MACS-Puffer und 20 µL MACS-MicroBeads pro 10^7 Zellen verwendet. Nach der Inkubation mit den entsprechenden MACS-MicroBeads wurde die Zellsuspension mit eiskaltem MACS-Puffer gewaschen und mit $300 \times g$ für 10 min

bei 4 °C zentrifugiert. Die mit den MicroBeads markierten Zellen wurden erneut in MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MACS-LS-Säule aufgetragen, welche zuvor mit MACS-Puffer equilibriert worden war. Die LS-Säule, welche aus einem ferromagnetischen Material besteht, wurde in den Magneten des MACS-Separators eingespannt und somit in der Säule ein magnetisches Feld erzeugt. Wenn die Zellsuspension durch die Säule fließt, werden die mit den magnetischen MicroBeads markierten Zellen in der Säule zurück gehalten, während alle anderen Zellen durch die Säule wandern (Negativfraktion). Zum Schluss wurde die Säule noch dreimal mit MACS-Puffer gespült, bevor die gebundenen Zellen mit 5 mL MACS-Puffer außerhalb des Magnetfeldes, mit Hilfe eines Stempels, eluiert wurden (Positivfraktion). Die Reinheit der separierten Zellpopulation wurde mittels populationspezifischer Antikörper durchflusszytometrisch (engl. *Fluorescence Activated Cell Scanning*, FACS) überprüft (siehe Abschnitt 3.4.4). Die Reinheitsüberprüfung von separierten Monozyten (CD14⁺ Zellen) und T-Zellen (CD3⁺ Zellen) ist in Abb. 5A und B dargestellt. Die Reinheit lag stets zwischen 95 % und 100 %.

3.4.1.3 PMN-Isolation

Humane PMNs (CD15⁺ Zellen; Granulozyten) wurden aus frischem Blut (EDTA-Blut) isoliert. 5 mL Blut wurden auf 5 mL PolymorphprepTM-Lösung geschichtet. Es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit $480 \times g$ für 35 min bei 18-22 °C (ohne Bremse). Ähnlich wie unter Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben, ordnen sich die unterschiedlichen Zellfraktionen ihrer Dichte nach an. Die Erythrozyten sedimentieren unter die PolymorphprepTM-Lösung, das Blutplasma und die Thrombozyten bilden die obere Phase des Gradienten. Dazwischen bilden sich zwei Schichten aus. Die untere, leicht diffusere Schicht besteht aus den polymorphkernigen Leukozyten (PMNs; Granulozyten) und die obere Schicht aus den mononukleären Zellen (PBMCs) des Blutes. Mittels einer Pasteurpipette wurde zunächst die PBMC-Schicht vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß mit eiskaltem PBS überführt und gegebenenfalls weiter wie unter Abschnitt 3.4.1.1 und Abschnitt 3.4.1.2 gewaschen und separiert. Die PMN-Schicht wurde ebenfalls mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, in dem ein 1:1 PBS - *Aqua dest.* - Gemisch vorgelegt war. Das mit Wasser verdünnte PBS ist nötig, um isoosmotische Bedingungen wiederherzustellen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit $400 \times g$ für 10 min bei RT. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut mit $400 \times g$ für 10 min bei RT zentrifugiert. Die Reinheit der isolierten PMN-Fraktion wurde mittels populationspezifischer Antikörper durchflusszytometrisch überprüft (siehe Abschnitt 3.4.4). In Abb. 5C ist die Reinheitsüberprüfung von PMNs (CD15⁺ Zellen) dargestellt. Die Reinheit der isolierter PMNs lag stets über 90 %.

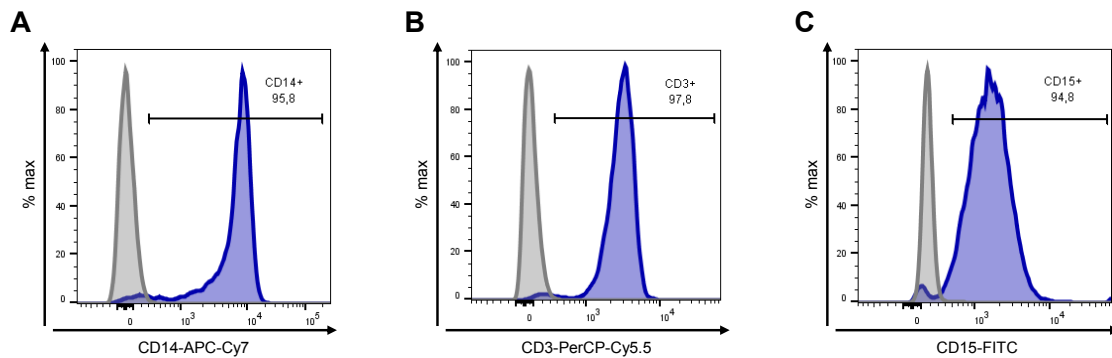


Abbildung 5: Reinheit der isolierten Immunzellpopulationen aus peripherem Blut.

Monozyten (CD14⁺ Zellen) (A), T-Zellen (CD3⁺ Zellen) (B) wurden aus PBMCs mit magnetischen anti-CD14 bzw. anti-CD3 MACS-MicroBeads separiert. PMNs (C) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Polymorphprep-Lösung isoliert. Die Reinheit der Positivfraktionen wurde mittels populationspezifischer Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS-Histogramme mit normalisierter Zellzahl (%max) gegen die Fluoreszenzintensität der populationspezifischen Marker (CD14, CD3, CD15). Die ungefärbte Kontrolle ist als graue Kurve und die Antikörper-gefärbte Probe als blaue Kurve dargestellt.

3.4.2 Kryokonservierung von Immunzellen

Die frisch isolierten PBMCs oder separierten Monozyten wurden mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend direkt in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und sofort in gekühlte Kryoröhrchen transferiert. Üblicherweise wurden 2×10^7 PBMCs und 8×10^6 Monozyten in 1 mL Einfriermedium pro Kryoröhrchen eingefroren. Die Zellen wurden zunächst im Einfrierbehälter „Mr. Frosty“ langsam mit einer Rate von ca. 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in der gasförmigen Phase des Stickstoffs bei ca. -160 °C.

3.4.3 Zellkultur

Kryokonservierte Immunzellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort wieder auf Eis überführt und in genügend Zellkulturmedium (mindestens 10 mL Zellkulturmedium pro 1 mL kryokonservierter Zellsuspension) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit $300 \times g$ für 10 min bei RT zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl und die Vitalität wurden mit einem digitalen Zellzählgerät (CASY[®] Cell Counter) bestimmt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) aufgenommen, entsprechend dem nachfolgenden Assay in der definierten Dichte in Zellkulturplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für einige Versuche wurden die Immunzellen (PBMCs, Monozyten, T-Zellen, PMNs) direkt nach der Isolation in Zellkulturmedium aufgenommen (keine Kryokonservierung) und wie oben beschrieben inkubiert.

3.4.4 Expressionsanalyse von Zellmarkern mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren (engl.: *Fluorescence Activated Cell Scanning*, FACS) kann die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern untersucht werden. Hierfür werden die Zellen mit entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Färbung von Oberflächenmolekülen Adhärente Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, wurden mit Accutase® (30-40 min Inkubation bei 37 °C) aus den entsprechenden Wells geerntet. Suspensionszellen, wie PBMCs, T-Zellen oder PMNs, wurden ohne zusätzlichen Enzymverdau geerntet. Die Zellen wurden in FACS-Reaktionsgefäße überführt und mit eiskaltem PBS mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit eiskaltem FACS-Puffer. Das Zellpellet wurde dann in 50 µL Antikörper-Mix (human-spezifische Antikörper in FACS-Puffer verdünnt) aufgenommen. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper und die Zusammensetzung der Mixe für die einzelnen Analysen sind den Tabellen 20 bis 23 zu entnehmen. Die Inkubation des Antikörper-Mix mit den Zellen erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem FACS-Puffer mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend in 100 µL einer 1 % PFA-Fixierungslösung aufgenommen und bei 4 °C bis zur Analyse gelagert.

Färbung von intrazellulären Markern Die Färbung intrazellulärer Marker schloss sich an die Färbung der Oberflächenmoleküle an. Hierbei erfolgte nach der Inkubation des Antikörper-Mix für die Oberflächenmoleküle ein Waschschrift mit FACS-Puffer und nachfolgend ein Fixierungs- und Permeabilisationsschritt. Dazu wurden die Zellen in 500 µL frisch angesetztem *BD Fix/Perm*-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 mL *BD 1 × Perm*-Puffer mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 50 µL Antikörper-Mix für die intrazellulären Marker (human-spezifische Antikörper in *1 × Perm*-Puffer verdünnt) aufgenommen. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper und die Zusammensetzung des Mix ist Tabelle 24 zu entnehmen. Die Inkubation des Antikörper-Mix mit den Zellen erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem *1 × Permeabilisierungs*-Puffer mit $300 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend in 100 µL einer 1 % PFA-Fixierungslösung aufgenommen und bei 4 °C bis zur Analyse maximal 5 Tage gelagert.

Messung und Analyse Die Proben wurden am *BD FACSCanto II* gemessen. Makrophagen wurden vor der Messung gefiltert (0,35 µm Porengröße), um Zellaggregation (Dubletten) zu vermeiden. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software *FlowJo*® Version 7 und 10. Die Gatingstrategien für die Analyse der Immunzellen der entsprechenden Experimente sind in den Abbildung 6 bis 10 dargestellt.

Tabelle 20: Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der PMN-Aktivierung.

Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
CD11b	AlexaFluor488	1:100
CD63	PE	1:20
CD66b	PerCP-Cy5.5	1:200
CD43	PE-Cy7	1:1000
CD35	APC	1:400
CD62L	APC-Cy7	1:20
CD16b	VioBlue	1:200
Life/Dead Marker	V510	1:300

Tabelle 21: Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der Monozyten-Charakterisierung und der Makrophagen-Polarisation.

Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
CD163	FITC	1:20
CD80	PE	1:20
CD16	PerCP-Cy5.5	1:200
HLA-DR	PE-Cy7	1:400
CD206	APC	1:100
CD14	APC-Cy7	1:100
Life/Dead Marker	V510	1:300

Tabelle 22: Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der Immunzellproliferation.

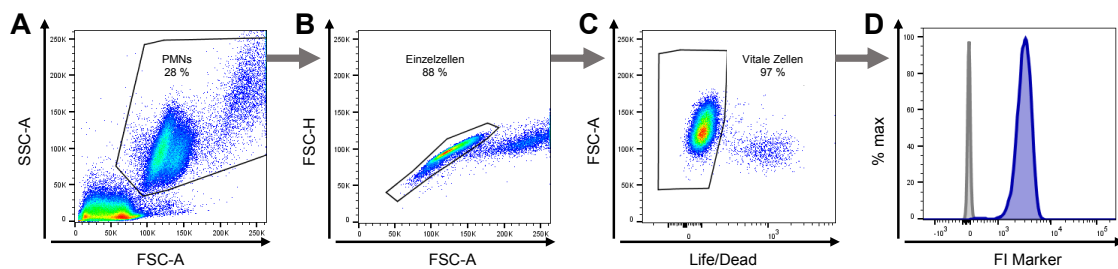
Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
Zytosplasma	CFSE	1:2000
CD8	PE	1:100
CD4	APC	1:50
CD14	V450	1:50
Life/Dead Marker	V510	1:300

Tabelle 23: Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse von T_{reg}.

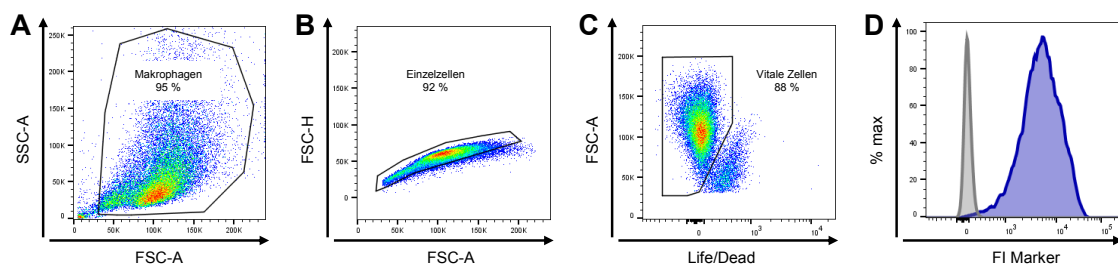
Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
CD25	PE	1:100
CD4	PerCP-Cy5.5	1:75
CD14	APC-Cy7	1:100
Life/Dead Marker	V510	1:300

Tabelle 24: Antikörper (anti-human) für die Detektion des intrazellulären T_{reg} Markers.

Antigen	Fluorochrom	Verdünnung
FoxP3	Alexa Flour 488	1:10


Abbildung 6: Gatingstrategie zur Analyse der PMN-Aktivierung

A) Zunächst wurde die PMN-Population anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-A) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-A) eingegrenzt. **B)** Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A) gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichtes (FSC-H) wurden die Einzelzellen definiert (Dubletten ausgegrenzt). **C)** Anschließend wurden alle vitalen Zellen durch den *Life/Dead*-Marker definiert. **D)** Bei der so eingegrenzten Zellpopulation wurde das Expressionsniveau der gefärbten Antigene/Marker (siehe Tabelle 20) über die entsprechende Fluoreszenzintensität (FI) für eine normalisierte Zellzahl (%max) bestimmt.


Abbildung 7: Gatingstrategie zur Analyse der Makrophagen-Polarisation

A) Zunächst wurde die Makrophagen-Population anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-A) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-A) eingegrenzt. **B)** Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A) gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichtes (FSC-H) wurden die Einzelzellen definiert (Dubletten ausgegrenzt). **C)** Anschließend wurden alle vitalen Zellen durch den *Life/Dead*-Marker definiert. **D)** Bei der so eingegrenzten Zellpopulation wurde das Expressionsniveau der gefärbten Antigene/Marker (siehe Tabelle 21) über die entsprechende Fluoreszenzintensität (FI) für eine normalisierte Zellzahl (%max) bestimmt.

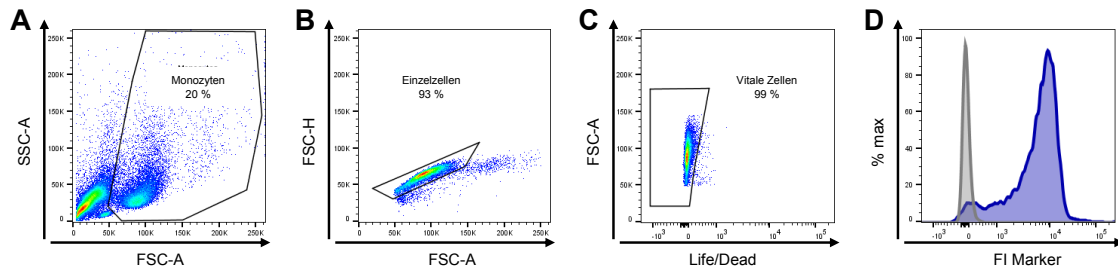


Abbildung 8: Gatingstrategie zur Analyse der Monozyten-Charakterisierung

A) Zunächst wurde die Monozyten-Population anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-A) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-A) eingegrenzt. **B)** Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A) gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichtes (FSC-H) wurden die Einzelzellen definiert (Dubletten ausgegrenzt). **C)** Anschließend wurden alle vitalen Zellen durch den *Life/Dead*-Marker definiert. **D)** Bei der so eingegrenzten Zellpopulation wurde das Expressionsniveau der gefärbten Antigene/Marker (siehe Tabelle 21) über die entsprechende Fluoreszenzintensität (FI) für eine normalisierte Zellzahl (%max) bestimmt.

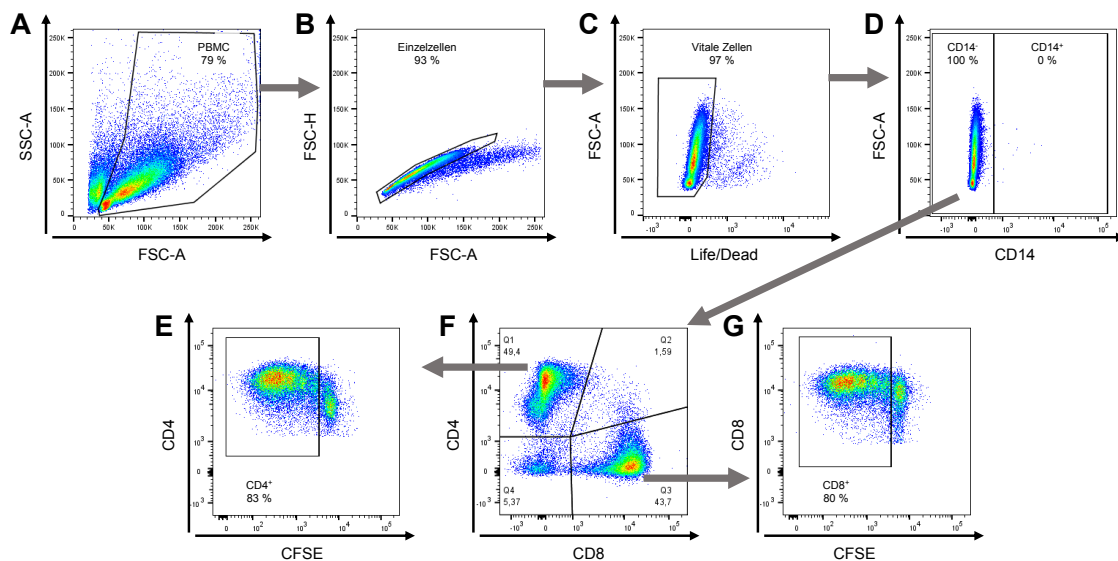


Abbildung 9: Gatingstrategie zur Analyse der Immunzellproliferation

A) Zunächst wurde die PBMC-Population anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-A) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-A) eingegrenzt. **B)** Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A) gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichtes (FSC-H) wurden die Einzelzellen definiert (Dubletten ausgegrenzt). **C)** Anschließend wurden alle vitalen Zellen durch den *Life/Dead*-Marker definiert. **D)** Zur spezifischen Analyse der T-Zellen wurden zunächst die CD14⁻ definiert und **F)** weiterführend die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen definiert. Der Anteil der proliferierten CD4⁺ (**E**) und CD8⁺ T-Zellen (**G**) wurde durch die Abnahme des CFSE-Fluoreszenzsignals quantifiziert.

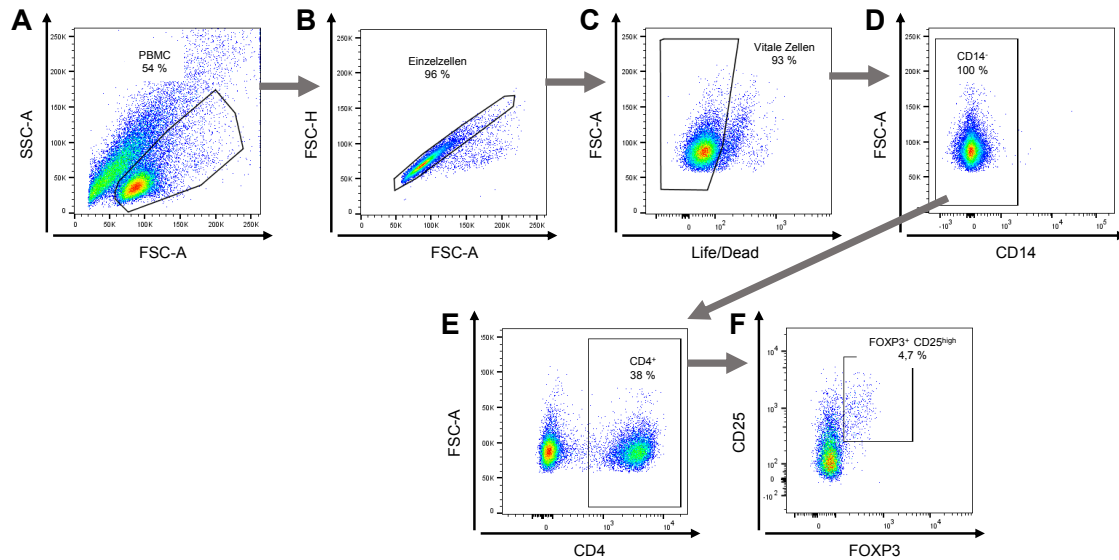


Abbildung 10: Gatingstrategie zur Analyse von T_{reg}

A) Zunächst wurde die PBMC-Population anhand der Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC-A) und der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-A) eingegrenzt. **B)** Durch das Auftragen der Fläche des Vorwärtsstreulichtes (FSC-A) gegen die Höhe des Vorwärtsstreulichtes (FSC-H) wurden die Einzelzellen definiert (Dubletten ausgegrenzt). **C)** Anschließend wurden alle vitalen Zellen durch den *Life/Dead*-Marker definiert. **D)** Zur spezifischen Analyse der T-Zellen wurden zunächst die CD14⁻ definiert und **E)** weiterführend die CD4⁺ T-Zellen definiert. **F)** Der Anteil der T_{reg}-Population wurde durch ein definiertes Gate im Bereich der FoxP3⁺ und CD25^{high} Zellen festgelegt.

3.5 Immunologische Assays

3.5.1 Endotoxinbestimmung

Alle verwendeten Medien waren entweder durch den Hersteller als “endotoxinfrei“ gekennzeichnet oder wurden vor Verwendung durch ein 0,22-µm-Filtersystem steril filtriert.

Das humane Aortengewebe wurde stichprobenartig mit unterschiedlichen Methoden auf dessen Endotoxingehalt überprüft:

Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) Endotoxin kann mittels des aus dem Blut von Pfeilschwanzkrebse gewonnenen Limulus-Amöbozyten-Lysats (LAL) nachgewiesen werden. Der Test beruht auf der Aktivierung des im Lysat enthalten Proenzym (Factor C) durch Endotoxin, wobei das aktivierte Enzym dann wiederum ein chromogenes Substrat spaltet. Das farbige Produkt (p-Nitroanilin) kann photometrisch gemessen werden. Dabei ist die Menge des umgesetzten Produktes proportional zur Endotoxinkonzentration der Probe.

Für die Bestimmung des Endotoxingehaltes wurde das Kit *Pierce™LAL Chromogenic Endotoxin Quantification* genutzt. Die Protokolldurchführung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend.

Die CFC, IFC und GA-fixierten humanen Aortengewebestücke wurden nach dem Auftau- und Waschprozess über 3 Tage in 1 mL DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte). Danach wurden 50 µL des Gewebekulturüberstands in eine auf 37 °C vorgewärmte 96-Wellplatte transferiert (als Duplikate). Die Herstellung des Endotoxin-Standards (0,1 - 1 EU/mL) mit dem im Kit enthaltenen LPS erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zu den Proben und den Standard-Verdünnungen wurden 50 µL LAL-Reagenz gegeben, gut gemischt und im Dunkeln bei 37 °C für 10 min inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Plattenlesegerät (SpectraMax 340PCO). Die Berechnung der Endotoxinkonzentration erfolgte mittels der linearen Standardkurvenanalyse, wobei Werte außerhalb des definierten Bereichs der Standardkurve extrapoliert wurden.

EndoZyme-Test Für die Bestimmung des Endotoxingehaltes mittels rekombinant hergestellten Faktors C wurde das Kit *EndoZyme®II* genutzt. Der Test beruht auf den gleichen Prinzipien wie der LAL-Test (siehe oben), jedoch ist der Faktor C der proteolytischen Kaskade synthetisch hergestellt und findet in Kombination mit einem synthetischen, fluorogenen Substrat Anwendung. Die Endotoxinbestimmung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend mit leichten Modifikationen.

Die CFC, IFC und GA-fixierten humanen Aortengewebestücke wurden nach dem Auftau- und Waschprozess für 1, 2, 5 oder 8 Tage in 1 mL DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte). Danach wurden 100 µL des Gewebekulturüberstandes in eine schwarze auf 37 °C vorgewärmte 96-Wellplatte transferiert (Duplikate). Die Herstellung des Endotoxin-Standards (0,005 - 50 EU/mL) mit dem im Kit enthaltenen LPS erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers in *Low-Binding*-Reaktionsgefäßen. Zu den Proben und den Standard-Verdünnungen wurden 100 µL Testreagenz gegeben, gut gemischt und im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Nach 60 min erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm in einem Plattenlesegerät (Tecan-Infinite 200 PRO). Die Berechnung der Endotoxinkonzentration erfolgte mittels eines nicht-linearen Regressionsmodells der Standardkurvenanalyse ($\log(x)/\log(y)$). Zur Datenauswertung wurde lediglich der Messwert zum 60-Minuten-Zeitpunkt und nicht des Zeitpunkts Null verwendet.

Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) Der MAT ist ein *In-vitro*-Test, welcher die Reaktion humaner Immunzellen auf Pyrogene abbildet und somit eine Aussage über die potentielle Immunreaktion im Menschen gibt. Endotoxin (LPS) bindet über den TLR-4 an die Monozyten und aktiviert eine *Downstream*-Kaskade, die zur Expression des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor (NF)- κ B führt. Durch diesen Transkriptionsfaktor wird die Bildung von TNF- α aktiviert. Neben LPS können auch andere Pyrogene die Freisetzung von TNF- α auslösen, womit der MAT, im Gegensatz zum LAL- oder EndoZyme-Test, auch Nicht-Endotoxin-Pyrogene erfasst.

Für den Test wurden zunächst die CFC-, IFC- und GA-fixierten humanen Aortengewebestücke nach dem Auftau- und Waschprozess über Nacht in RPMI (ohne Zusätze) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (48-Wellplatte) und am nächsten Tag 500 μ L abgenommen. Für den MAT wurden humane PBMCs aufgetaut (siehe Abschnitt 3.4.3). 1×10^6 PBMCs wurden in 500 μ L RPMI (ohne weitere Zusätze) in einer 24-Wellplatte ausgesät und 500 μ L des zu testenden Gewebeüberstandes wurden hinzugegeben. Als Positivkontrolle (PK) wurden die PBMCs mit 100 ng/mL LPS stimuliert und als Negativkontrolle (NK) wurden die PBMCs lediglich in RPMI kultiviert. Die stimulierten PBMCs wurden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 800 μ L Überstand wurden abgenommen und für 1 min mit $1000 \times g$ zentrifugiert, um mögliche Suspensionszellen und Zelltrümmer abzutrennen. Proben wurden bei -80 °C bis zur Analyse gelagert, bevor die Bestimmung der TNF- α -Konzentration mittels ELISA erfolgte (siehe Abschnitt 3.3.3.2).

3.5.2 Migrations-Assay

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Immunzellen wurde das Chemotaxissystem *ChemoTX*[®] von Neuro Probe (Membran-Porengröße 3 μ m) verwendet (Abb. 11A). Jeweils 37,5 μ L konditioniertes Diätmedium von CFC-, IFC-, oder GA-fixiertem humanen Aortengewebe, Diätmedium als Negativkontrolle und KM einer mit α CD3/CD28 stimulierten PBMC-Kultur als Positivkontrolle (siehe Abschnitt 3.3.2) wurden im unteren Well des Chemotaxissystems vorgelegt (Abb. 11B). Weiterhin dienten 50 ng/mL humanes IL-6, IL-8, MCP-1 und ein Mix aus diesen drei Zytokinen als Kontrollansatz. Auf die untere Wellplatte wurde die Membran gelegt.

PMNs, Monozyten und T-Zellen wurden aus Frischblut isoliert (siehe Abschnitt 3.4.1) und in Diätmedium resuspendiert. Jeweils 30.000 Zellen in 40 μ L wurden auf die obere Seite der Membran gesät. Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C

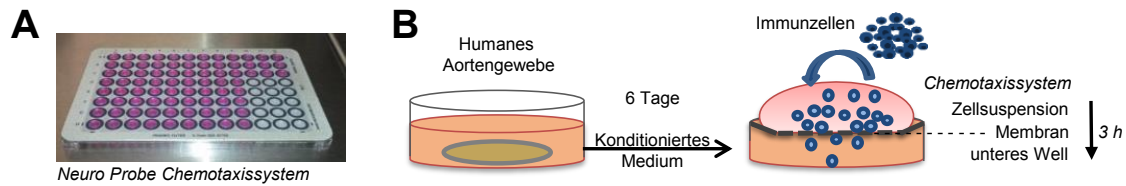


Abbildung 11: Experimentelles Design zum Migrations-Assay

Mittels Chemotaxissystem *ChemoTX*[®] von Neuro Probe (A) wurde das Migrationsverhalten humaner Immunzellen (PMNs, Monozyten und T-Zellen) untersucht. B) Detaillierte Beschreibung zur Durchführung siehe Text.

und 5 % CO₂ wurde die Membran wieder vorsichtig von der Wellplatte entfernt, die restliche Zellsuspension seitlich auf ein Papiertuch abgetropft und mit Hilfe des Kits *Hemacolor*[®], *Rapid Stain* den Herstellerangaben entsprechend fixiert (Methanol/Aceton-Gemisch) und gefärbt (Hematoxylin und Eosin). Vor der Färbung wurden die nicht-migrierten Zellen von der Oberseite der Membran mit Hilfe eines Wattestäbchens sorgsam abgewischt, um sie von der Analyse auszuschließen. Die an der Unterseite der Membran haftenden Zellen wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss-Axio Scope) bestimmt und fotografiert. Dabei wurden jeweils 3 Membranausschnitte pro Ansatz in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe des Plugins „Cell Image Analyzer“ (CIA) (programmiert und zur Verfügung gestellt von Tilo Dehne) wurden die Fotos mit der Software *Fiji-ImageJ* [150] prozessiert und die Zellen gezählt.

Zur Berechnung des Wertes aller Zellen auf der Membranunterseite wurde der Mittelwert der gezählten Zellen auf den 3 Membranausschnitten pro Well auf die gesamte Fläche des Wells bezogen. Im genutzten Chemotaxissystem betrug die Fläche eines Wells 25 mm². Die Sichtfläche des Membranausschnitts auf den Fotos bei 20-facher Vergrößerung betrug 0,3588 mm².

$$\text{Zellen auf Membranunterseite} = \frac{\text{Mittelwert gezählte Zellen} \times \text{Fläche eines Wells}}{\text{Sichtfläche des Membranausschnitts}}$$

Zusätzlich zu den Zellen an der Membranunterseite wurden auch die migrierten Zellen im unteren Well in die Berechnung der Gesamtanzahl migrierter Zellen einbezogen. Dazu wurden 20 µL gut resuspendierter Zellsuspension aus dem unteren Well entnommen und die Zellzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

$$\text{Gesamtanzahl migrierter Zellen} = \text{Zellen auf Membranunterseite} + \text{Zellen im unteren Well}$$

3.5.3 Kokultur humaner Immunzellen auf Aortengewebe

3.5.3.1 PMN-Aktivierungs-Assay

PMNs wurden frisch aus EDTA-Blut isoliert (Abschnitt 3.4.1.3), entsprechend gewaschen und in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) resuspendiert. Dabei war stets auf ein behutsames Resuspendieren zu achten, da PMNs leicht zu aktivieren sind. Der PMN-Aktivierungs-Assay wurde in Zusammenarbeit mit Matthias Becker etabliert.

Aktivierungsskontrollen 4×10^5 PMNs wurden in 400 μ L Zellkulturmedium in einer 48-Wellplatte ausgesät. Für die Aktivierung wurden die PMNs entweder mit 500 ng/mL LPS, 10 ng/mL TNF- α oder 40 ng/mL des Tripeptids fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) stimuliert. Zusätzlich erfolgte als Kontrolle eine Kultivierung der PMNs ohne weitere Stimuli (Ko). Die Zellen wurden 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

PMN-Gewebe-Kokultur Die CFC-, IFC- und GA-fixierten Aortengewebestücke wurden auf dem Boden einer 48-Wellplatte platziert (*Tunica adventitia* nach unten und *Tunica intima* nach oben gerichtet) und mit einem Silikonring fixiert. 1×10^5 PMNs in 100 μ L Zellkulturmedium wurden in das Lumen des Silikonrings auf das Aortengewebe gesät. Nach ca. 30 min, in denen sich die PMNs auf dem Gewebe absetzen konnten, wurden weitere 500 μ L Zellkulturmedium hinzugefügt. Zusätzlich erfolgte als Kontrolle eine Kultivierung der PMNs auf der Zellkulturplatte (Ko). Die Zellen wurden 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Analyse Nach der Kultivierung wurde der Überstand abgenommen und als KM im nachfolgenden Monozyten-Assay genutzt (siehe Abschnitt 3.5.4). Zur Charakterisierung der Oberflächenmarker wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 20) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 6). Zusätzlich erfolgte stets eine Analyse der Oberflächenmarkerexpression der PMNs direkt nach der Isolation aus dem Blut (Zeitpunkt t_0). Für die Auswertung der Markerexpression der PMNs nach 4 h erfolgte eine Normalisierung auf die Markerexpression dieser PMNs zum Zeitpunkt t_0 .

3.5.3.2 Makrophagen-Polarisations-Assay

Kryokonservierte humane Monozyten (CD14⁺ Zellen) wurden aufgetaut und 2×10^6 Zellen in je 2 mL Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) in einer 6-Wellplatte ausgesät. Die Zellen wurden dabei mit 50 ng/mL M-CSF stimuliert und 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ zu M0-Makrophagen differenziert. Die M0-Makrophagen wurden mittels Zellschaber aus der 6-Wellplatte geerntet, in PBS aufgenommen, einmal gewaschen und in Zellkulturmedium resuspendiert.

Polarisationskontrollen 8×10^5 bzw. 3×10^5 M0-Makrophagen wurden in einer 24- bzw. 48-Wellplatte ausgesät. Für die Polarisation zum M1-Phänotyp wurden die Makrophagen mit 100 ng/mL LPS und 20 ng/mL IFN- γ stimuliert. Zur M2a-Polarisation erfolgte eine Stimulation mit 20 ng/mL IL-4, für eine Polarisation zum M2c-Phänotyp mit 20 ng/mL IL-10. Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung von M0-Makrophagen ohne weitere Stimuli (Ko). Die Zellen wurden 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ polarisiert.

Makrophagen-Gewebe-Kokultur Die Aortengewebestücke nach CFC, IFC und GA-Fixierung wurden auf dem Boden einer 48-Wellplatte platziert (*Tunica adventitia* nach unten und *Tunica intima* nach oben gerichtet) und mit einem Silikonring fixiert. 1×10^5 M0-Makrophagen in 100 μ L Zellkulturmedium wurden in das Lumen des Silikonrings auf das Aortengewebe gesät. Nach ca. 30 min, in denen sich die Makrophagen auf dem Gewebe absetzen konnten, wurden weitere 200 μ L Zellkulturmedium hinzugefügt. Zusätzlich erfolgte als Kontrolle eine Kultivierung der Makrophagen auf der Zellkulturplatte (Ko). Die Zellen wurden 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ polarisiert.

TGF- β 1-Signalweg-Modulation Um mögliche Effekte des TGF- β 1 zu überprüfen, wurde zur oben beschriebenen Makrophagen-Gewebe-Kultur 1 μ g/mL neutralisierender Antikörper α TGF β 1,2,3 hinzugegeben (TGF β -nAK).

Makrophagen-Kultur mit Aortengewebe-KM Der Einfluss löslicher Faktoren aus dem Aortengewebe auf die Makrophagenpolarisation wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde ein Silikonring in einem Well einer 48-Wellplatte platziert. 1×10^5 M0-Makrophagen in 100 μ L Zellkulturmedium wurden in das Lumen des Silikonrings auf die Zellkulturplastik gesät. Nach ca. 30 min, in denen sich die Makrophagen absetzen konnten, wurden 300 μ L KM von CFC-, IFC- oder GA-fixiertem Aortengewebe (6 Tage kultiviert in Zellkulturmedium) hinzugefügt (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Zellen wurden 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Analyse Für alle oben beschriebenen Makrophagen-Kokulturen fand eine Charakterisierung der Oberflächenmarker statt. Dazu wurden die Makrophagen, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 21) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 7). Für die Auswertung der Markerexpression der Makrophagen aus der Gewebe-Kokultur erfolgte eine Normalisierung auf die jeweilige ungefärbte Kontrolle, da die Makrophagen durch die Kultivierung auf dem Aortengewebe unterschiedliche Autofluoreszenzen aufwiesen. Beispielhaft sind die Autofluoreszenzen der Makrophagen für drei verschiedene Durchflusszytometer-Kanäle in Abb. 12 abgebildet. Vor allem für Makrophagen, welche auf GA-fixiertem Gewebe kultiviert wurden, konnte bei der Messung am Durchflusszytometer im APC- und im FITC-Kanal eine erhöhte Autofluoreszenz detektiert werden (Abb. 12B+C). Aus diesem Grund wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIs) der Antikörper-gefärbten Makrophagen mittels Division durch die MFIs der jeweiligen ungefärbten Makrophagen normalisiert.

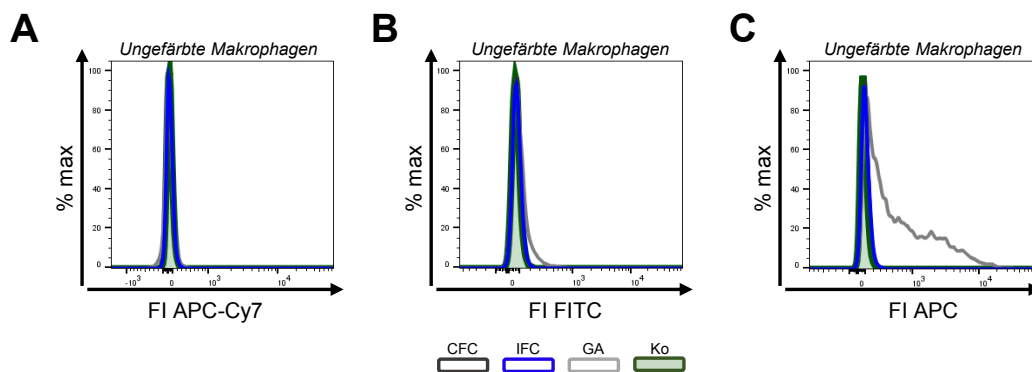


Abbildung 12: Autofluoreszenz der Makrophagen nach Kokultivierung auf Aortengewebe

Repräsentative FACS-Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität (Autofluoreszenz) der ungefärbten Makrophagen nach Kultivierung auf CFC-Gewebe (dunkelgrau Kurve), IFC-Gewebe (blaue Kurve), GA-fixiertem Gewebe (hellgrau Kurve) und auf der Zellkulturplatte (Ko) (grüne gefüllte Kurve). Beispielhaft sind die Fluoreszenzintensitäten (FI) für die Durchflusszytometer-Kanäle für APC-Cy7 (A), FITC (B) und APC (C) für eine normalisierte Zellzahl (%max) dargestellt.

3.5.4 Monozytenaktivierung durch lösliche Faktoren

PMNs sezernieren nach Aktivierung Zytokine und Chemokine, welche weitere Immunzellen, vor allem Monozyten anlocken und ebenfalls aktivieren. Im folgenden Assay sollte diese Interaktion nachgestellt werden und der Einfluss der aus der PMN-Gewebe-Kokultur (Abschnitt 3.5.3.1) sezernierten Faktoren auf den Phänotyp von Monozyten untersucht werden. Kryokonservierte humane Monozyten ($CD14^+$ Zellen) wurden aufgetaut und 5×10^5 Zellen in je 100 μ L Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und

1 % Glutamin) in einer 48-Wellplatte ausgesät. Zu den Monozyten wurden 300 μ L KM der jeweiligen PMN-Gewebe-Kokulturen gegeben (CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebe) sowie KM der als Kontrolle auf der Zellkulturplatte kultivierten PMNs (Ko). Außerdem wurde nach 4 h KM von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe in Zellkulturmedium ohne kokultivierte PMNs vom jeweils selben Gewebespende gewonnen (\emptyset Gewebe-KM), um den Einfluss der allein vom Gewebe sezernierten Faktoren abgrenzen zu können. Ebenfalls 300 μ L des \emptyset Gewebe-KM wurde zu den Monozyten gegeben. Als Kontrolle in dieser Gruppe wurden Monozyten ohne weitere Stimuli kultiviert (\emptyset Ko).

Die Zellen wurden 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Abschließend wurden die Monozyten, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 21) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 8). Für die Auswertung der Markerexpression der Monozyten erfolgte eine Normalisierung auf die jeweilige ungefärbte Kontrolle.

3.5.5 Immunzellproliferations-Assay

Die Induktion und Modulation der Proliferation humaner Immunzellen unter dem Einfluss löslicher Faktoren aus dem Aortengewebe wurde anhand der Abnahme des Fluoreszenzsignals des Farbstoffs Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) nachgewiesen.

Kryokonservierte humane PBMCs wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) aufgenommen, zentrifugiert, anschließend einmal in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/mL in PBS eingestellt. Zu der Zellsuspension wurde der Farbstoff CFSE in einer finalen Konzentration von 2,5 μ M/mL gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch das Hinzufügen des gleichen Volumens an gekühltem, humanem AB-Serum wurde die Reaktion wieder gestoppt. Die CFSE-gefärbten PBMCs wurden anschließend zweimal in AB-Serum-haltigem Medium gewaschen bevor sie in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) aufgenommen wurden.

3×10^5 CFSE-gefärbte PBMCs wurden in 400 μ L Zellkulturmedium in einer 48-Wellplatte ausgesät. Zusätzlich wurden entsprechend 400 μ L KM von CFC- oder IFC-Aortengewebe (siehe Abschnitt 3.3.2) bzw. nur Zellkulturmedium als Negativkontrolle hinzugegeben. Für die Experimente zur Induktion der Proliferation durch Gewebe-KM wurden die PBMCs mit 12,5 ng/mL α CD3-Antikörper (Klon: OKT3) als Positivkontrolle stimuliert. Bei den Experimenten zur Modulation der Proliferation erfolgte eine basale Stimulation aller PBMCs mit 12,5 ng/mL α CD3.

Die so behandelten PBMCs wurden 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Charakterisierung der Oberflächenmarker wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 22) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 9).

3.5.6 Nachweis der Induktion regulatorischer T-Zellen

Die T-Zell-Subpopulation der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) wurde ebenfalls im Zuge der Modulation der Proliferation unter dem Einfluss löslicher Faktoren aus kryokonserviertem Aortengewebe untersucht.

Kryokonservierte bzw. frisch isolierte humane PBMCs wurden in Zellkulturmedium (RPMI mit 10 % humanem AB-Serum, 1 % Pen/Strep und 1 % Glutamin) aufgenommen, zentrifugiert und anschließend einmal in PBS gewaschen. 6×10^5 PBMCs wurden in 200 µL Zellkulturmedium in einer 48-Wellplatte ausgesät. Zusätzlich wurden entsprechend 200 µL KM (siehe Abschnitt 3.3.2) von CFC- oder IFC-Aortengewebe (6 Tage kultiviert in Zellkulturmedium) bzw. nur Zellkulturmedium als Negativkontrolle hinzugegeben. Weiterhin erfolgte für alle Ansätze eine basale Stimulation mit 83,3 ng/mL α CD3 und 166,7 ng/mL α CD28. Die so behandelten PBMCs wurden 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Charakterisierung der Oberflächenmarker sowie der intrazellulären Marker der T_{reg} wurden die PBMCs, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 23) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abb. 10).

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Probenvorbereitung Die mit Makrophagen kokultivierten Gewebestücke (siehe Assay im Abschnitt 3.5.3.2) wurden in der 48-Wellplatte zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Proben mit 500 µL 2,5 % Glutaraldehyd für 10 min bei RT inkubiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Die Proben wurden anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Proben jeweils 5 min mit 500 µL aufsteigend 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 95 % unvergälltem Ethanol inkubiert. Abschließend wurden die Proben noch zweimal mit 100 % Ethanol für jeweils 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden bis zur Trocknung bei 4 °C gelagert. Die chemische Trocknung erfolgte durch Hexamethyldisilazan (HMDS). Zu den Proben wurde 100 µL HMDS gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Inkubation mit

jeweils frischen 100 μ L HMDS für 10 min und die Lufttrocknung der Proben über Nacht unter dem Abzug bei RT.

Für die Messung wurden die trockenen Proben mit einem Klebeplättchen (*Leit-Tab*) auf den Stiftprobenhaltern befestigt. In einem Zerstäubungsprozess (*Sputtern*) wurden die Proben für 30 s in einem Vakuum-*FineCoater* in einer Argon-Atmosphäre (8 Pa) dünn mit Gold beschichtet.

Messung und Analyse Die Messung der Proben erfolgte am Rasterelektronenmikroskop (REM) (JEOL-JCM 6000 Benchtop) im *High-Vacuum*-Modus mit 10 kV in 70-facher und 1500-facher Vergrößerung.

3.7 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Software *GraphPad Prism* Version 6.0. Für die erhobenen Daten wurde jeweils der Mittelwert in Kombination mit dem Standardfehler (engl.: *Standard Error of the Mean*, SEM) angegeben. Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit nur einer Variablen wurden durch den nicht-parametrischen t-Test (Mann-Whitney-Test) auf statistische Signifikanz überprüft. Statistische Unterschiede unter einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,5 % wurden als signifikant gewertet (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ oder ### $p < 0,001$ bei Mann-Whitney-Test).

Bei mehr als zwei Gruppen mit nur einer Variablen wurde eine nicht-parametrische, einfaktorielle Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) mit anschließendem Dunn's Post-Test angewendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit mehr als einer Variable fand eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (engl.: *two way-ANOVA*) in Kombination mit einem Bonferroni Post-Test Anwendung. Statistische Unterschiede unter einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,5 % wurden als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oder *** $p < 0,001$ bei Kruskal-Wallis-Test bzw. mehrfaktorieller Varianzanalyse).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Präparation und Konservierung humaner Aortengewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Kryokonservierungsmethode auf die Immunogenität von humanem, kardiovaskulärem Gewebe untersucht. Hierbei wurde die Methode der eisfreien Kryokonservierung (IFC) mit der bereits in der Klinik etablierten Methode der konventionellen Kryokonservierung (CFC) verglichen. Zusätzlich wurde die Fixierung mittels Glutaraldehyd (GA) analysiert, da diese Methode ebenfalls Anwendung für kardiovaskuläre Transplantate findet.

Die vor Beginn der Arbeit vorhandenen Protokolle für CFC und IFC waren für ein Einfriervolumen von 80 mL auf Herzklappen-Homografts (bestehend aus dem herznahen Gefäß inklusive der Herzklappe) etabliert [39]. Da die Verfügbarkeit von Herzklappen-Homografts begrenzt ist, wurde für alle folgenden Untersuchungen humane Aorta als Modellgewebe für kardiovaskuläre Gewebe bzw. Herzklappen genutzt. Außerdem wurden für die geplanten Immunogenitätstestungen kleinere Gewebestücke verwendet, da dies für die durchzuführenden *In-vitro*-Assays nötig war. Die Konservierung sollte stets unter standardisierten Bedingungen stattfinden. Aus diesem Grund wurden aus dem Aortengewebe 8-mm-große Gewebestücke gestanzt (Abb. 13A), randomisiert der CFC-, IFC- oder GA-Fixierungsmethode zugeordnet und einzeln eingefroren bzw. fixiert. Die Gewebe wurden mindestens einen Monat gelagert, bevor sie wieder aufgetaut und gewaschen wurden (Abb. 13B). Dabei wurden die ursprünglichen Protokolle an die neuen Anforderungen der kleineren Gewebestücke angepasst, wodurch das Einfriervolumen auf 1,8 mL reduziert werden konnte. Anschließend erfolgten die Charakterisierung des Aortengewebes (z.B. histologische Analysen, Gewebewitalitätsuntersuchungen, Zytokinbestimmungen) und weiterführende immunologische Assays, um den Einfluss der Konservierungsmethode zu analysieren (Abb. 13C).

Die Verringerung der Gewebegröße vom kompletten Homograft auf 8-mm-Gewebestücke und des Einfriervolumens von 80 mL auf 1,8 mL wurde durch die Kontrolle des Tempera-

turverlaufs im CFC-Prozess (Abb. 13D) validiert. Wichtig war hierbei, dass die am Kristallisationspunkt freigesetzte Wärme (Erstarrungswärme) nicht wieder zu einem starken Temperaturanstieg in der Probe führte. Aus diesem Grund ist eine kurzzeitige Temperaturniedrigung in der Kammer des Einfrierautomaten von -4°C auf -20°C nötig (blaue Kurve, Abb. 13D). Dadurch sank die Temperatur in der Gewebeprobe mit einer kontinuierlichen Rate von ca. $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (rote Kurve, Abb. 13D).

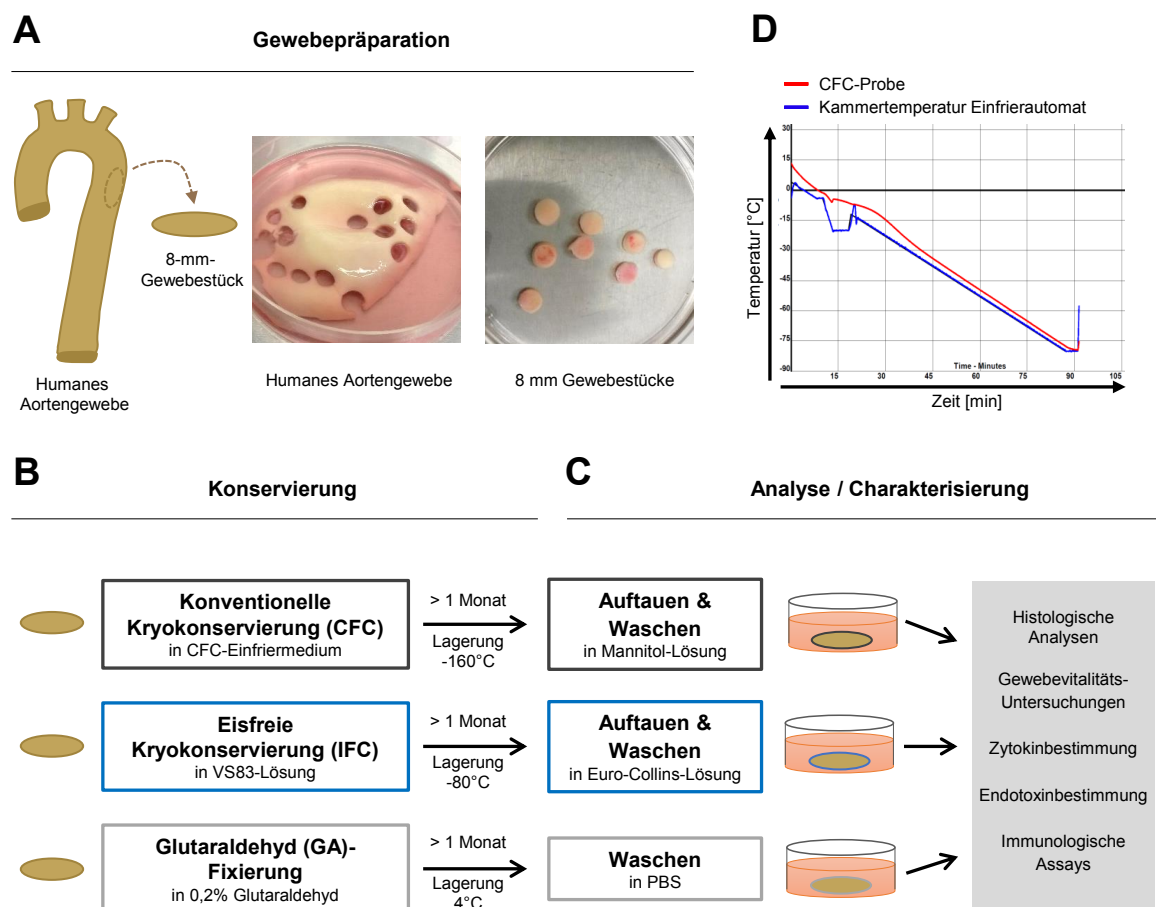


Abbildung 13: Schematische Übersicht der Präparation, Konservierung und Analyse humaner Aortengewebe für Immunogenitätstestungen

A) Nach initialer Antibiotikabehandlung des humanen Aortengewebes wurden mittels Biopsiestanzen 8 mm große Gewebestücke gestanzt. Makroskopische Aufnahmen des humanen Aortengewebes (die Gefäßinnenwand ist sichtbar) während der Präparation (links) und der ausgestanzten 8 mm Gewebestücke (rechts) sind dargestellt. B) Diese Gewebestücke wurden randomisiert der CFC, IFC oder GA-Fixierungsmethode zugeordnet, dem Protokoll entsprechend konserviert (mit CFC-Einfriermedium, VS83-Lösung oder 0,2 % Glutaraldehyd) und für mindestens einen Monat (bei -160°C , -80°C oder 4°C) gelagert. C) Für die spätere Analyse wurden die Gewebestücke aufgetaut bzw. gewaschen, in Zellkulturmedium, DMEM oder RPMI überführt und mittels unterschiedlicher Methoden charakterisiert bzw. immunologische Assays durchgeführt. D) Ein repräsentativer Verlauf der Temperatur während des CFC-Einfrierprozesses im Einfrierautomaten ist dargestellt. Die blaue Kurve zeigt die Temperatur in der Kammer des Einfrierautomaten, die rote Kurve zeigt die Temperatur der CFC-Gewebeprobe (Aortengewebestück in 1,8 mL CFC-Einfriermedium). Die Temperatur der Probe sinkt kontinuierlich mit ca. $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Adäquat zum CFC-Protokoll wurden die Volumina auch für die IFC-Methode angepasst. Die neu etablierten Protokolle (siehe Methoden Abschnitt 3.2) für CFC, IFC ebenso wie die GA-Fixierung wurden für alle nachfolgenden Untersuchungen angewendet.

4.2 Charakterisierung konservierter humaner Aortengewebe

4.2.1 IFC bewahrt die typische Gewebestruktur, aber verringert die metabolische Aktivität

Zur Charakterisierung des humanen Aortengewebes nach unterschiedlicher Konservierung wurde zunächst die Morphologie mittels H&E-Färbung betrachtet (Abb. 14A). Hierbei zeigte sich, dass die charakteristische histologische Struktur des Aortengewebes nach CFC und IFC erhalten blieb. In der *Tunica media* waren jeweils die regelmäßig und wellenförmig angeordneten elastischen Fasern sowie die Kerne der glatten Muskelzellen zu erkennen. Hingegen zerstörte die GA-Fixierung die Anordnung der elastischen Fasern. Bei allen Konservierungsmethoden waren die durch Hämatoxylin angefärbten Zellkerne im Aortengewebe sichtbar. Es fand demnach keine Dezellularisierung durch CFC, IFC oder GA-Fixierung und den anschließenden Auftau- und Waschprozess statt.

Da die typische Gewebestruktur durch die beiden Kryokonservierungsmethoden bewahrt blieb, sollte überprüft werden, ob die Vitalität des Gewebes ebenfalls vergleichbar ist. Deshalb wurde die metabolische Aktivität des Aortengewebes mittels MTS-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen im CFC-Gewebe eine signifikant höhere Aktivität im Vergleich zum IFC-Gewebe aufwiesen, wobei die IFC-Methode die metabolische Aktivität des Gewebes auf einen minimalen Wert absenkte (Abb. 14B). Die GA-Fixierung reduzierte ebenfalls die metabolische Aktivität des Gewebes auf ein intermediäres Niveau.

Die Gefäßinnenwand (*Tunica intima*) der Aorta ist mit einer einschichtigen Endothelzellschicht ausgekleidet. Da Endothelzellen relevant für die Immunogenität des Gewebes sind, sollte untersucht werden, ob die Konservierungsmethode einen Einfluss auf den Erhalt dieser Zellschicht hat. Mittels Immunfluoreszenzfärbung erfolgte der Nachweis des Endothelzellmarkers CD31, welcher sowohl nach CFC als auch nach IFC auf der *Tunica intima* detektierbar war (Abb. 15). Die Endothelzellschicht des Aortengewebes wird demnach durch keine der beiden Kryokonservierungsmethoden eliminiert.

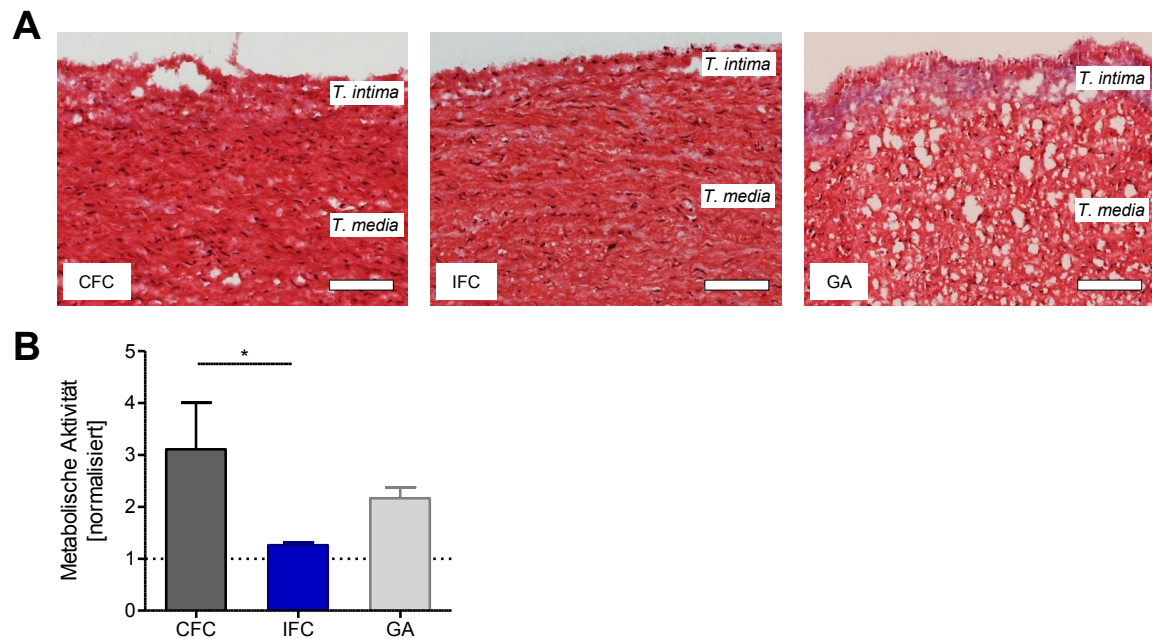


Abbildung 14: Einfluss der Konservierungsmethode auf die histologische Struktur und metabolische Aktivität humaner Aortengewebe

A) Gezeigt sind repräsentative H&E-Färbungen von Kryo-Gewebeschnitten humaner Aorta nach CFC, IFC und GA-Fixierung. Die Querschnitte des Aortengewebes zeigen die Gefäßinnenwand (*Tunica intima*) und Abschnitte der *Tunica media* der Aorta. In der *Tunica media* sind elastische Fasern sowie die Kerne der glatten Muskelzellen zu erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen 125 µm. B) Die metabolische Aktivität der Aortengewebe nach CFC, IFC und GA-Fixierung wurde mittels MTS-Assay bestimmt, nachdem die Gewebestücke über Nacht in DMEM inkubiert wurden. Die Werte (n=3-7) wurden auf das Medium normalisiert (=1, gestrichelte Linie) und sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05 ermittelt.

Bei GA-fixiertem Aortengewebe konnte hingegen das CD31-Antigen nicht nachgewiesen werden, da auf Grund der hohen Autofluoreszenz und möglicher Epitopmaskierung durch GA keine Signaldetektion möglich war (Daten nicht gezeigt).

Die Immunogenität der Endothelzellen, aber auch der glatten Muskelzellen des Aortengewebes wird maßgeblich durch die Expression von MHC-Molekülen bestimmt. Die Zellen sind dadurch potentiell in der Lage (Allo-)Antigene zu präsentieren, wobei HLA-DR für die Aktivierung von T-Helferzellen von besonderer Bedeutung ist. Ziel war es daher ebenfalls durch Immunfluoreszenzfärbung herauszufinden, ob im Aortengewebe nach CFC oder IFC das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR noch nachzuweisen ist. Sowohl nach CFC als auch nach IFC konnte das Molekül HLA-DR detektiert werden (Abb. 16). Die Expression des Moleküls war auf Zellen in der *Tunica intima*, aber auch in der *Tunica media* nachweisbar. Es ist hierbei anzumerken, dass keine gleichzeitige Ko-Färbung von CD31, *smooth muscle actin* oder CD45 mit HLA-DR durchgeführt wurde.

Deshalb kann nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, ob die HLA-DR Moleküle von Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder ansässigen bzw. infiltrierten Immunzellen exprimiert wurden.

Die Kryokonservierungsmethode hat demnach keinen Einfluss auf den Verbleib der Endothelzellen, was durch den Nachweis von CD31 bestätigt wurde, und verändert die Expression des immunologisch relevanten MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR auf den vaskulären Zellen nicht.

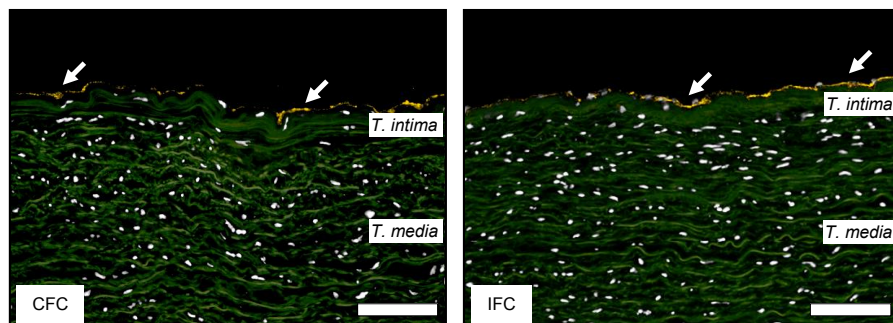


Abbildung 15: Endothelzellnachweis auf humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Kryokonservierung

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Kryo-Gewebequerschnitten humaner Aorta nach CFC und IFC. Die Färbung von humanem CD31 (gelb) weist die Endothelzellen (weiße Pfeile) der Gefäßinnenwand (*Tunica intima*) nach. In der *Tunica media* zeigen die elastischen Fasern eine grüne Autofluoreszenz. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (weiß). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

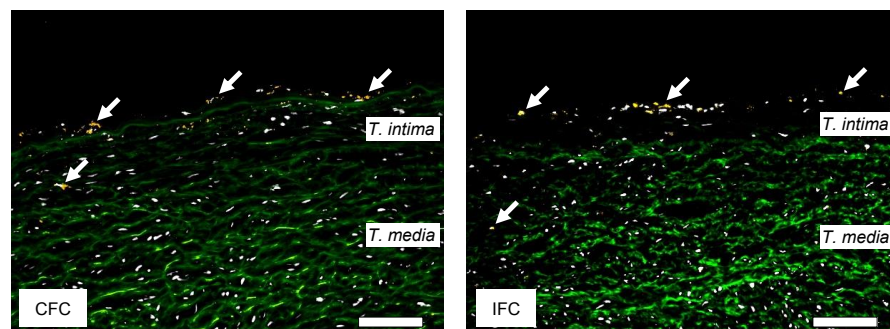


Abbildung 16: Nachweis von HLA-DR in humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Kryokonservierung

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Kryo-Gewebequerschnitten humaner Aorta nach CFC und IFC. Die gelbe Färbung weist HLA-DR⁺ Zellen (weiße Pfeile) sowohl in der *Tunica intima* als auch in der *Tunica media* nach. In der *Tunica media* zeigen die elastischen Fasern eine grüne Autofluoreszenz. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (weiß). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

4.2.2 CFC induziert partiell zelluläre Nekrose und Apoptose

Auf Grund des Nachweises der verminderten metabolischen Aktivität im IFC-Gewebe wurde die Vitalität des Aortengewebes genauer untersucht. In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob die Konservierungsmethode einen Einfluss auf die Induktion von Nekrose oder Apoptose in den Gewebezellen hat.

Durch die Bestimmung der Aktivität freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) aus dem Gewebe können Rückschlüsse auf Zellmembranschädigungen, wie sie bei Nekrose stattfinden, gezogen werden. Im CFC-Gewebe wurde eine hohe LDH-Aktivität nachgewiesen, wohingegen IFC- und GA-fixiertes Aortengewebe keine LDH-Aktivität aufwies (Abb. 17A).

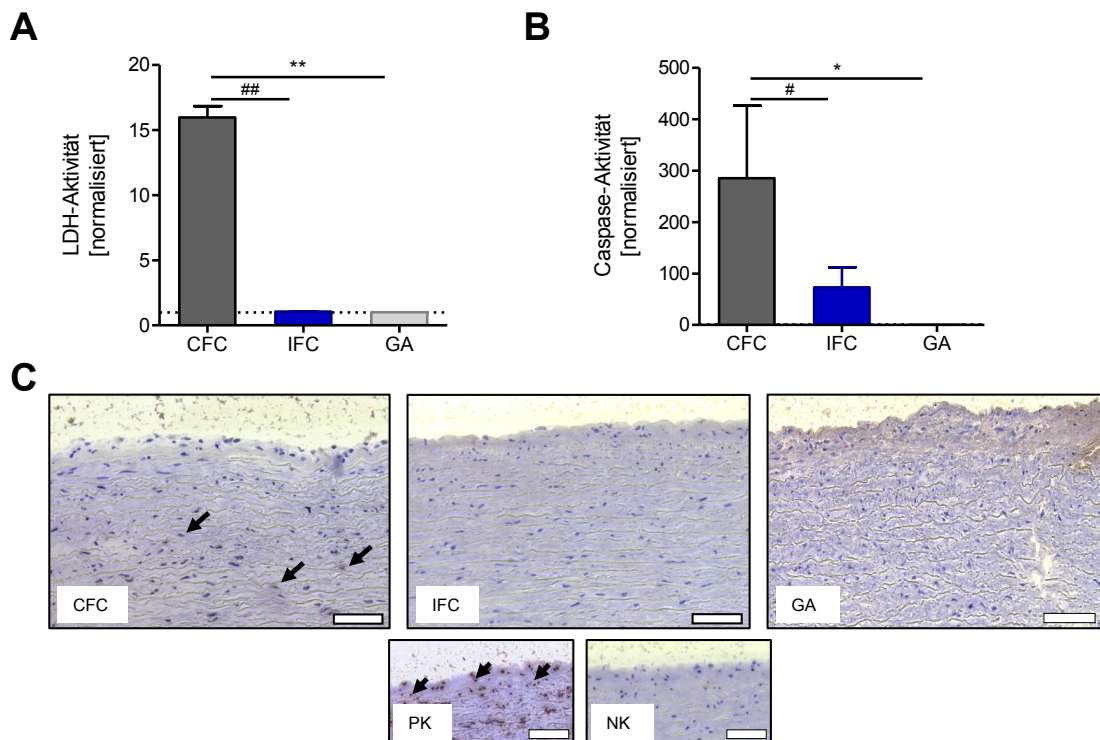


Abbildung 17: Bestimmung nekrotischer und apoptotischer Ereignisse in humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

Die Induktion der Nekrose in Aortengewebe nach CFC, IFC und GA-Fixierung wurde über die LDH-Aktivität (**A**) und die Induktion der Apoptose über die Aktivität der Caspasen-3 und -7 (**B**) bestimmt, nachdem die Gewebestücke für 90 min in DMEM inkubiert wurden. Die Werte (LDH-Assay: n=4, Caspase-Assay: n=2-8) wurden auf den Wert des Mediums normalisiert (=1, gestrichelte Linie) und sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, **p < 0,01 bzw. für CFC vs. IFC durch den Mann-Whitney-Test mit # p < 0,05, ## p < 0,01 ermittelt. **C**) Durch TUNEL-Färbung des Aortengewebes waren Zellkerne mit DNA-Fragmentierung (braun) im CFC-Gewebe und in der mit DNase behandelten Positivkontrolle (PK) sichtbar (schwarze Pfeile). In der Negativkontrolle (NK) und den anderen Gewebeschnitten konnte keine spezifische Färbung detektiert werden. Die Maßstabsbalken entsprechen 75 µm.

Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass durch die CFC-Methode nekrotische Ereignisse induziert wurden. Weiterhin wurde die Induktion der zellulären Apoptose untersucht. Zum einen erfolgte die Bestimmung früher Ereignisse in der apoptotischen Signalkaskade über die Aktivität der Enzyme Caspase-3 und -7. Hierbei zeigte CFC-Gewebe ebenfalls eine signifikant höhere Caspase-Aktivität als IFC- oder GA-fixiertes Gewebe (Abb. 17B). Dies deutet auf frühe zelluläre Apoptose vor allem im CFC-Gewebe hin. Zum anderen wurde die Fragmentierung der DNA, ein späteres Ereignis in der Apoptosekaskade, histologisch mittels TUNEL-Färbung nachgewiesen. Im CFC-Gewebe waren vereinzelt Zellkerne mit fragmentierter DNA zu erkennen, was jedoch nicht bei IFC- oder GA-fixiertem Gewebe der Fall war. Dies weist übereinstimmend zur ermittelten Caspase-Aktivität auf die Anwesenheit apoptotischer Zellen im CFC-Gewebe hin (Abb. 17C).

4.2.3 Die Gewebe-vermittelte Zytokinsekretion wird durch die Konservierungsmethode moduliert

Zytokine und Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort. Vor allem ist dabei das Verhältnis pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6, MCP-1 oder IL-8 und anti-inflammatorischer Zytokine wie z.B. TGF- β oder IL-10 für die Rekrutierung und Aktivierung der Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems entscheidend. Insofern war es wichtig zu untersuchen, welche Signalstoffe vom Aortengewebe nach den unterschiedlichen Konservierungsmethoden abgegeben werden und in welchen Mengen sie freigesetzt werden. Dazu wurden die Aortengewebestücke in DMEM inkubiert und anschließend das konditionierte Medium (KM) analysiert.

Für einen ersten Überblick erfolgte ein einmaliges Screening mittels Multiplex-Analyse zur Bestimmung der Konzentration von 13 inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Abb. 18). Die Zytokine IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-23 wurden in geringen Konzentrationen von unter 30 pg/mL sowohl von CFC- als auch von IFC-Gewebe freigesetzt. Hohe Konzentrationen der Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8 und IL-33 konnten im KM des CFC-Gewebes, aber nur im geringen Umfang im KM des IFC-Gewebes nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass IL-10 in geringen Mengen von weniger als 2 pg/mL von CFC- und von IFC-Gewebe sezerniert wurde. Das Niveau aller analysierten Zytokine für GA-fixiertes Gewebe war ebenso sehr gering bzw. nicht detektierbar. Die Zytokine IFN- α 2, IL-12 (p70) und IL-18 wurden analysiert, konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Weiterführend ergab die Bestimmung der Zytokine MCP-1, IL-6 und IL-10 mittels ELISA im KM der konservierten Aortengewebe nach einer zweitägigen Kulturphase, dass CFC-

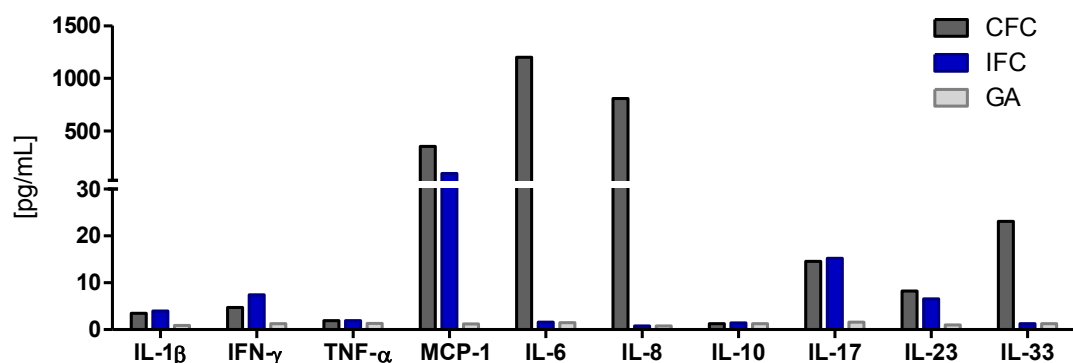


Abbildung 18: Übersicht freigesetzter Zytokine und Chemokine aus humanem Aortengewebe

CFC-, IFC-, und GA-fixierte Aortengewebe wurden einen Tag in DMEM inkubiert. Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in konditioniertem Medium erfolgte einmalig als Screening mittels Multiplex-Analyse (n=1).

Gewebe signifikant erhöhte Mengen an MCP-1 und IL-6 freisetzte (Abb. 19A+B). IL-10 zeigte nach 2 Tagen höhere Werte für CFC- und IFC-Gewebe als nach einem Tag, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Kryokonservierungsmethoden. Die IL-10-Freisetzung von GA-fixiertem Gewebe blieb generell auf einem sehr geringen Niveau (Abb. 19C).

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Zytokine kontinuierlich über einen längeren Zeitraum aktiv von den Zellen des Aortengewebes sezerniert werden. Dazu wurden die Gewebestücke über 6 Tage inkubiert, die Zytokinkonzentration an jedem Tag mittels ELISA bestimmt und die absolute Zytokinmenge pro Gewebestück berechnet. Sowohl für MCP-1 als auch für IL-6 war über die Zeit ein Anstieg, d.h. eine Akkumulation der freigesetzten Zytokinmenge im KM von CFC-Gewebe zu detektieren (Abb. 19D+E). In der Kultur des IFC- und GA-fixierten Gewebes blieb die Menge der sekretierten Zytokine hingegen auf dem niedrigen Niveau konstant bzw. verringerte sich über die Zeit.

Durch die Konservierungsmethode wird demzufolge das Profil der vom Aortengewebe freigesetzten Zytokine und Chemokine verändert. Dabei wurden von GA-fixiertem Gewebe fast keine der analysierten Zytokine mehr sezerniert. IFC-behandeltes Gewebe zeigte vornehmlich geringere Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu CFC-Gewebe.

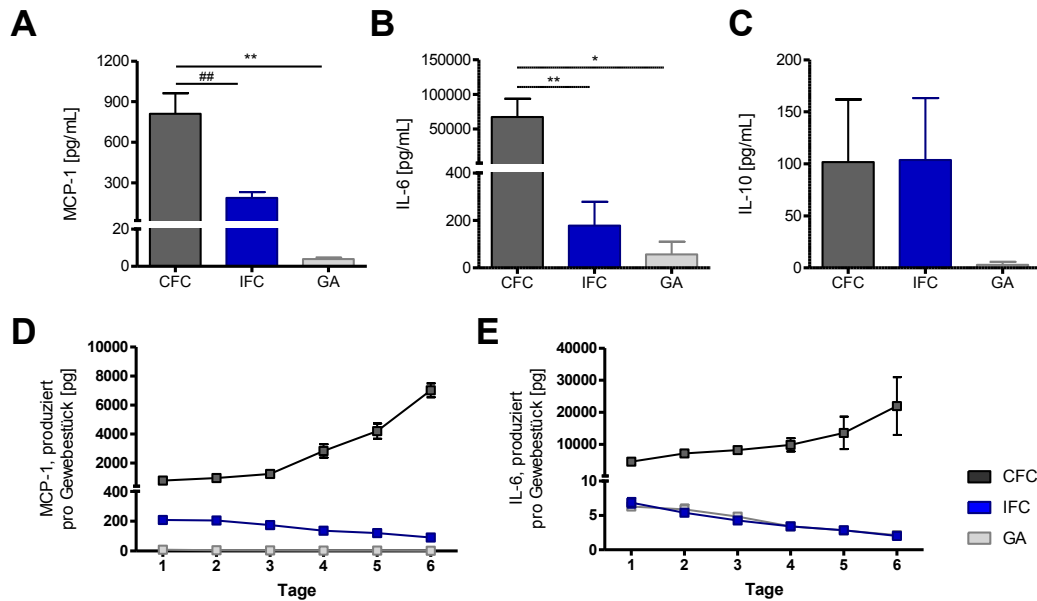


Abbildung 19: Freigesetzte Zytokine und Chemokine aus humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebe wurden 2 Tage in DMEM inkubiert. Die Konzentration von MCP-1 (A), IL-6 (B) und IL-10 (C) wurde in konditioniertem Medium mittels ELISA bestimmt. Die Werte (n=4-8) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 bzw. für CFC vs. IFC durch den Mann-Whitney-Test mit # p < 0,05, ## p < 0,01 ermittelt. Die Kinetik des freigesetzten MCP-1 (D) und IL-6 (E) wurde über 6 Tage analysiert, indem an den Tagen 1-6 die Zytokinkonzentration im konditionierten Medium mittels ELISA bestimmt und auf die Menge pro Gewebestück berechnet wurde. Die Werte (n=2) sind als Mittelwert ± SEM gezeigt.

4.2.3.1 TGF- β 1 wird durch IFC partiell aktiviert

TGF- β gehört zu den Zytokinen, welche in der Regulation der Wundheilung und Geweberegeneration von besonderem Interesse sind. TGF- β ist in den meisten Geweben vorhanden, wo es vor allem an die extrazelluläre Matrix gebunden vorliegt [151]. Das Zytokin tritt in drei Isoformen auf, wobei TGF- β 1 die vorherrschende Rolle in der Immunregulation einnimmt [152]. TGF- β 1 liegt vorrangig als inaktiver Komplex vor, in welchem es an das *Latency-Associated Protein* (LAP) gebunden ist. Erst durch Aktivierung wird TGF- β 1 freigesetzt und kann als biologisch aktive Form agieren. Die Summe der aktiven und inaktiven TGF- β 1-Formen stellt das Gesamt-TGF- β 1 dar. Um das Gesamt-TGF- β 1 im KM des Aortengewebes bestimmen zu können, musste zunächst eine Ansäuerung der Proben erfolgen. Dadurch fand eine vollständige Überführung des an das LAP-gebundenen, inaktiven TGF- β 1 in die aktive Form statt.

CFC-Gewebe zeigte eine signifikant höhere Freisetzung von Gesamt-TGF- β 1 im Vergleich zu IFC- oder GA-fixiertem Gewebe (Abb. 20A). Interessanterweise war dieses Verteilungs-

muster nicht bei der aktiven Form des TGF- β 1 wiederzufinden. Hier waren im KM des IFC-Gewebes signifikant höhere Konzentrationen des aktiven TGF- β 1 zu finden (Abb. 20B). Bei dem Vergleich der freigesetzten Mengen von aktivem und gesamtem TGF- β 1 ist hervorzuheben, dass das Niveau des vom IFC-Gewebe freigesetzten, aktiven TGF- β 1 (61 ± 22 pg/mL) in etwa dem Niveau des vom IFC-Gewebe freigesetzten Gesamt-TGF- β 1 (86 ± 24 pg/mL) entsprach. TGF- β 1 lag demnach im KM des IFC-Gewebes überwiegend in der biologisch aktiven Form vor, wohingegen beim CFC-Gewebe der Großteil des TGF- β 1 in der inaktiven Form vorlag. GA-fixiertes Gewebe sekretierte hingegen nur sehr geringe Mengen an aktivem und inaktivem TGF- β 1.

Analog zu den oben genannten Zytokinen wurde auch die Kinetik des TGF- β 1 in den Gewebekulturen über 6 Tage analysiert. Für das Gesamt-TGF- β 1 konnte ein Anstieg über die Zeit, d.h. eine Akkumulation der freigesetzten Zytokinmenge im KM vom CFC-Gewebe beobachtet werden (Abb. 20C). Im KM des IFC- und GA-fixierten Gewebes blieb die Menge konstant auf einem niedrigen Niveau. Ebenso blieb die Menge des aktiven TGF- β 1, welches aus dem IFC-Gewebe freigesetzt wurde, auf einem gleichbleibenden Niveau (Abb. 20D). Die Menge des sekretierten aktiven TGF- β 1 aus dem CFC- und GA-Gewebe stieg ebenfalls nicht über die Zeit an, sondern verblieb auf dem sehr niedrigen Ausgangsniveau.

Wie bereits erwähnt, ist im ELISA für die Aktivierung des inaktiven TGF- β 1 ein Ansäuerungsschritt nötig. Dieser Prozess findet ebenso unter physiologischen Bedingungen im Gewebe statt. TGF- β 1 kann durch eine Veränderung des pH-Wertes, aber auch durch oxidative, enzymatische oder mechanische Vorgänge aktiviert und vom LAP getrennt werden [153].

Im folgenden Schritt wurde geprüft, ob die Komponenten der IFC-Lösung VS83 oder des CFC-Einfriermediums eine Aktivierung von inaktivem TGF- β 1 auslösen können. Dazu wurde KM des CFC-Gewebes (CFC-KM), welches nachweislich hohe Konzentrationen von TGF- β 1 in der LAP-gebundenen, inaktiven Form enthält (siehe Abb. 20), während der Durchführung des ELISAs statt mit der Ansäuerungs-Lösung (Bestandteil des ELISA-Kits) mit Komponenten des IFC- und CFC-Einfriermediums inkubiert. 25 % 1,2-Propandiol, 21 % Formamid und 36 % DMSO, wie sie anteilig in der IFC-Lösung VS83 enthalten sind, aktivierten jeweils $0,6 \pm 0,3$ %, $7,9 \pm 3,3$ %, und $16,3 \pm 3,4$ % des inaktiven TGF- β 1, wobei der Ansäuerungsschritt des ELISA-Standardprotokolls einer 100 %-igen Aktivierung entsprach (Abb. 21). Hingegen aktivierten 10 % DMSO, wie es im CFC-Medium enthalten ist, nur $1,1 \pm 0,3$ % des TGF- β 1.

Die Untersuchungen zum TGF- β 1 im unterschiedlich konservierten Aortengewebe zeigten also, dass Komponenten der IFC-Lösung VS83 die Kapazität haben, TGF- β 1 zum Teil in die aktive Form zu überführen.

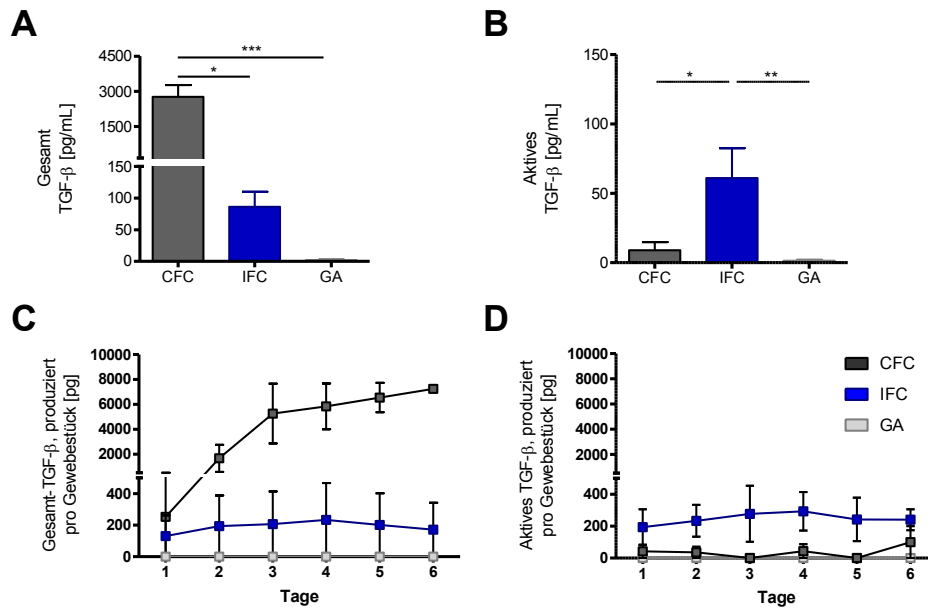


Abbildung 20: Freigesetztes TGF-β1 aus humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

CFC-, IFC- und GA-fixierte Aortengewebe wurden 2 Tage in DMEM inkubiert. Die Konzentration von Gesamt-TGF-β1 (**A**) und aktivem TGF-β1 (**B**) wurde in konditioniertem Medium mittels ELISA bestimmt. Die Werte (n=8) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ermittelt. Die Kinetik des freigesetzten Gesamt-TGF-β1 (**C**) und aktiven TGF-β1 (**D**) wurde über 6 Tage analysiert, indem an den Tagen 1-6 die Zytokinkonzentration im Gewebe-konditionierten Medium mittels ELISA bestimmt und auf die Menge pro Gewebestück berechnet wurde. Die Werte (n=2-3) sind als Mittelwert ± SEM gezeigt.

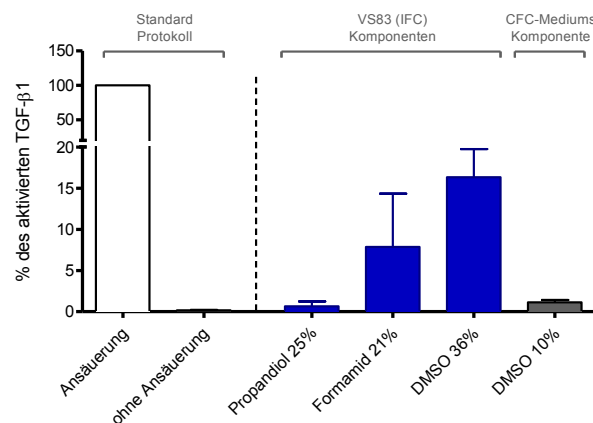


Abbildung 21: TGF-β1-Aktivierung durch Komponenten des IFC- und CFC-Einfriermediums

Die Menge an aktivem TGF-β1 wurde in konditioniertem Medium (KM) von CFC-Aortengewebe mittels ELISA bestimmt. Dem Standard-ELISA-Protokoll folgend, wurden die Proben angesäuert, um inaktives, LAP-gebundenes TGF-β1 zu aktivieren (Ansäuerung). Die Menge des durch Ansäuerung aktivierten TGF-β1 in CFC-Gewebe-konditioniertem Medium wurde 100 % gesetzt. Ohne Ansäuerung konnte nur bereits aktives TGF-β1 detektiert werden (< 1 %). Weiterhin sind die prozentualen Anteile an aktiviertem TGF-β1 durch die Komponenten der IFC-Lösung VS83 (25 % 1,2-Propandiol, 21 % Formamid und 36 % DMSO) und der Hauptkomponente des CFC-Mediums (36 % DMSO) dargestellt. Die Werte (n=3) sind als Mittelwert + SEM gezeigt.

4.2.4 Untersuchungen zu Immunglobulin-Ablagerungen

Im Zuge von krankhaften Veränderungen der Aorta, z.B. beim Aneurysma, wie es bei den Aortengewebespendern diagnostiziert worden war, kann es zu Ablagerungen von Immunglobulinen im oder auf dem Gewebe kommen [154–156]. Die angelagerten Immunglobuline (Ig) der Klassen M oder G können die Aktivierung des Immunsystems zur Folge haben, wie es im Rahmen dieser Arbeit in *In-vitro*-Assays analysiert wurde (siehe Abschnitt 4.3).

Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, inwieweit nach den unterschiedlichen Konservierungsmethoden IgM oder IgG an der Aorta der Gewebespenders, speziell an der Gefäßinnenseite, vorhanden ist.

Die immunhistochemische Färbung ergab, dass bei der Mehrheit der analysierten Aortengewebe weder nach CFC, IFC oder GA-Fixierung IgG auf der Oberfläche nachweisbar war. Nur bei vorheriger Inkubation des Aortengewebes mit humanem IgG (Positivkontrolle, PK) konnte das Immunglobulin detektiert werden (Abb. 22). Lediglich bei einigen wenigen Gewebespendern konnte in der Aorta angelagertes IgG und IgM nachgewiesen werden, jedoch ohne Unterschiede zwischen CFC, IFC oder GA-Fixierung in der semi-quantitativen Analyse (Daten nicht gezeigt).

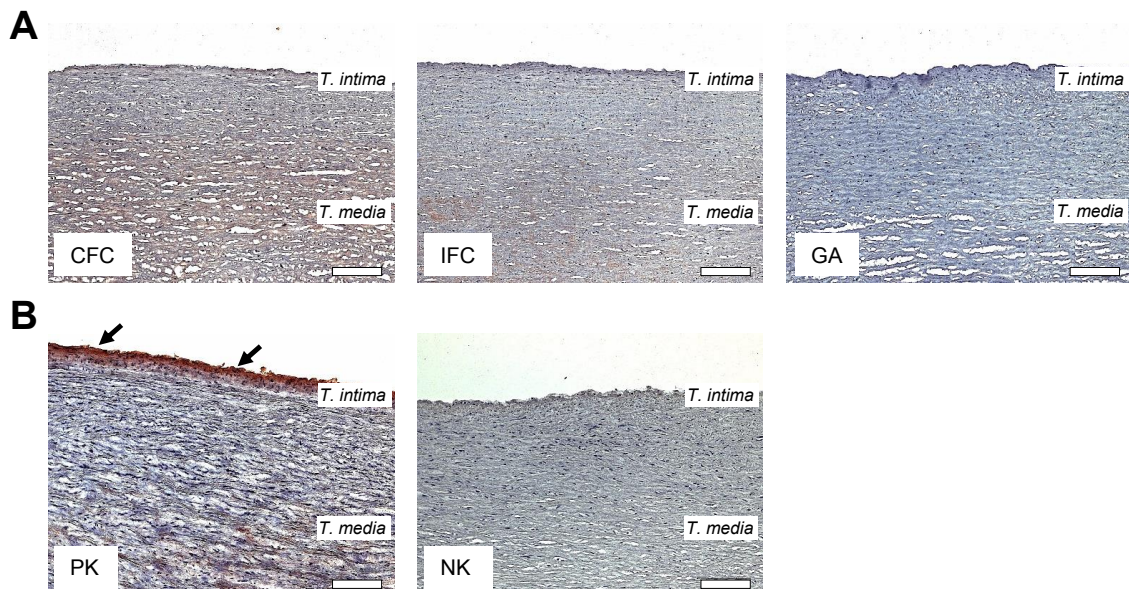


Abbildung 22: IgG-Ablagerungen auf humanem Aortengewebe

A) Gezeigt sind repräsentative immunhistochemische IgG-Anfärbungen von Kryo-Gewebequerschnitten humaner Aorta nach CFC, IFC und GA-Fixierung. Es sind die Gefäßinnenwand (*Tunica intima*) und Abschnitte der *Tunica media* der Aorta sichtbar. B) Als Positivkontrolle (PK) erfolgte eine vorherige Inkubation des Gewebes mit humanem aggregiertem IgG (schwarze Pfeile). Bei der Negativkontrolle erfolgte die Färbung ohne primären IgG-Antikörper. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm .

4.3 Immunogenitätsuntersuchungen konservierter humaner Aortengewebe *in vitro*

4.3.1 Überprüfung des Endotoxingehalts

Endotoxin ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Es aktiviert Immunzellen *in vitro* und *in vivo* und gehört damit zu den stärksten Pyrogenen (fiebrerzeugende Substanzen). Für immunologische Assays sollten daher alle Probenmaterialien und Reagenzien auf Endotoxin getestet sein und eine hinreichend geringe Konzentration an Endotoxin und Pyrogenen enthalten, sodass eine Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen werden kann.

Die CFC-, IFC- und GA-fixierten humanen Aortengewebestücke wurden nach dem Auftau- und Waschprozess stichprobenartig mittels verschiedener Nachweismethoden auf ihren Endotoxingehalt getestet. Der LAL- und der EndoZyme-Test sind dabei zwei sehr sensitive Testsysteme zum Nachweis von Endotoxin. Beide Methoden weisen jedoch lediglich das Vorhandensein von Endotoxin nach, aber nicht den daraus resultierenden biologischen Effekt. Der MAT hingegen bildet die Reaktion humaner Immunzellen (Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$) auf Pyrogene ab und kann somit eine Aussage über die mögliche stattfindende Immunreaktion im Menschen geben. Neben LPS können auch andere Pyrogene die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ auslösen, womit der MAT auch Nicht-Endotoxin-Pyrogene erfasst.

Mittels LAL-Test wurden 3 Spendergewebe getestet (Abb. 23A). Die CFC-Gewebe zeigten eine Endotoxinbelastung von $1,33 \pm 0,3$ EU/mL. Diese Werte wurden durch Extrapolation berechnet, da sie oberhalb des letzten Wertes der linearen Standardkurve lagen. Die Endotoxinbelastung der IFC- bzw. GA-fixierten Gewebe betrug weniger als 0,05 EU/mL bzw. 0,5 EU/mL. Mit dem EndoZyme-Test wurden zu einem späteren Zeitpunkt zwei weitere Spendergewebe getestet (Abb. 23B). Hierbei lag die Endotoxinbelastung für die zwei CFC-Gewebe unter 1,5 EU/mL und für IFC- und GA-fixiertes Gewebe unter 1 EU/mL.

Um die biologischen Effekte einer möglichen Endotoxinkontamination zu testen, wurden 7 Spendergewebe im MAT untersucht. Weil bei den MATs unterschiedliche Immunzellspender verwendet wurden, kam es zu starken inter-experimentellen Schwankungen der detektierten $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen (Abb. 23C). Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Werte deshalb auf die jeweilige Positivkontrolle (PK, Stimulation mit 100 ng/mL LPS) normalisiert (Abb. 23D). Die CFC-Gewebe induzierten eine Freisetzung von durchschnittlich 106 ± 60 pg/mL $\text{TNF-}\alpha$ aus humanen Immunzellen.

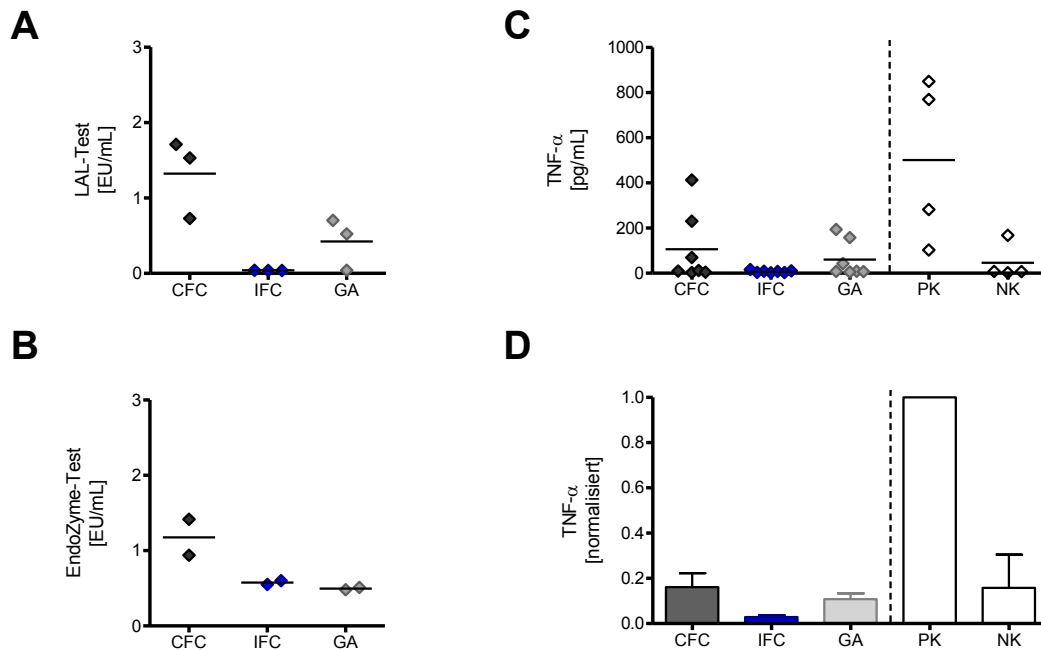


Abbildung 23: Bestimmung des Endotoxingehalts in humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung unter Verwendung unabhängiger Testsysteme

Endotoxin wurde im konditionierten Medium von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe mittels LAL-Test (**A**) und EndoZyme-Test (**B**) bestimmt. Neben den Einzelwerten (LAL-Test: $n=3$, EndoZyme-Test: $n=2$) sind die Mittelwerte dargestellt. **C**) Humane PBMCs wurden für 24 h mit konditioniertem Medium von Aortengewebe nach CFC, IFC und GA-Fixierung stimuliert und die Freisetzung von TNF- α wurde mittels ELISA bestimmt (MAT; Monozyten-Aktivierungs-Test). Als Positivkontrolle (PK) wurden PBMCs mit 100 ng/mL LPS stimuliert und als Negativkontrolle (NK) ohne zusätzlichen Stimulus kultiviert. Zu den Einzelwerten ($n=7$ für die Proben, $n=4$ für PK und NK) sind die Mittelwerte dargestellt. **D**) Die Einzelwerte des MAT wurden auf Grund der hohen inter-experimentellen Schwankung, auf die PK des jeweiligen Experiments normalisiert ($=1$) und sind als Mittelwert + SEM gezeigt.

Jedoch blieb dieser Wert noch deutlich unter dem Level der Positivkontrolle. Das Niveau der TNF- α -Konzentrationen, welches durch IFC- oder GA-fixiertes Gewebe induziert wurde, lag unter dem der Negativkontrolle.

Basierend auf dem Wissen, dass humane CFC-Aortengewebe eine minimale Endotoxinbelastung aufweisen können, die jedoch keinen maßgeblichen Einfluss auf die Immunreaktion *in vitro* hat und dass IFC- und GA-fixierte Aortengewebe nicht Endotoxin belastet sind, wurden alle nachfolgenden funktionellen immunologischen Untersuchungen durchgeführt.

4.3.2 Das Komplementsystem wird unabhängig von der Konservierungsmethode aktiviert

Das Komplementsystem, bestehend aus einer Kaskade von Enzymen, hat eine initiale Funktion beim Beginn der Immunantwort. Implantate adsorbieren Proteine von Pathogenen oder humane Plasmaproteine, welche nachfolgend das Komplementsystem aktivieren können. Das Protein C4 spielt eine zentrale Rolle im klassischen und alternativen Weg der Komplementaktivierung. Es bindet an die Oberfläche von Zellen oder Geweben und wird gespalten, wodurch der weitere Verlauf der Komplementkaskade vorangetrieben wird. Aus diesem Grund ist die Anlagerung von C4 am Gewebe ein Indikator für die Komplementaktivierung. Zur experimentellen Untersuchung wurde dazu das unterschiedlich konservierte humane Aortengewebe mit humanem Plasma inkubiert. Anschließend erfolgte eine histologische Untersuchung der C4-Anlagerung mittels Immunfluoreszenzfärbung. Eine vorherige Inkubation der Aortengewebestücke mit aggregiertem humanem IgG, einem Aktivator des klassischen Wegs, diente als Positivkontrolle [157].

In Abb. 24A ist zu erkennen, dass nach Inkubation mit humanem Plasma C4 am Geweberand sowohl bei CFC-, IFC- als auch bei GA-fixierter Aorta, nachweisbar war (pink).

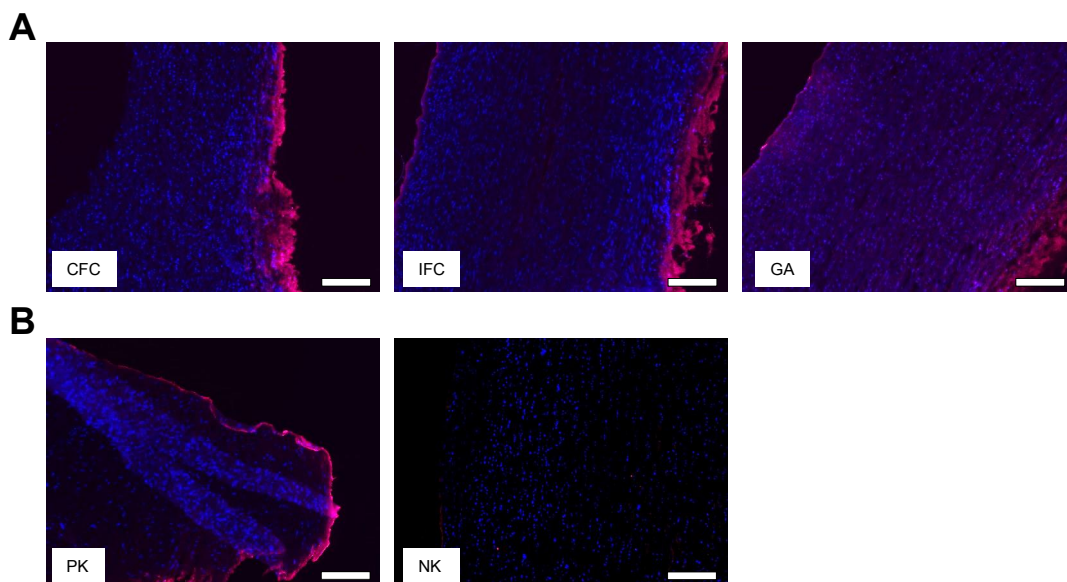


Abbildung 24: Komplementaktivierung durch humanes Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

Humane Aortengewebe wurden 30 min mit humanem Plasma inkubiert und die Anlagerung des Komplementfaktors C4 analysiert. **A)** Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Aortengewebe-Kryoschnitten nach CFC, IFC und GA-Fixierung. Die Färbung von humanem C4 (pink) weist die Anlagerung des Komplementfaktors nach. **B)** Als Positivkontrolle (PK) erfolgte eine vorherige Inkubation des Gewebes mit humanem aggregiertem IgG. Als Negativkontrolle wurden die Gewebe mit PBS anstelle von humanem Plasma inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 400 µm.

Semi-quantitativ war kein Unterschied zwischen den Proben zu erkennen. Die Positivkontrolle (PK) zeigte ebenfalls eine starke C4-Anlagerung, wohingegen sich im Fall der Negativkontrolle (NK), bei der das Gewebe in PBS inkubiert wurde, nachweislich kein C4 angelagert hatte (Abb. 24B). Das Komplementsystem wurde demnach durch humanes Aortengewebe aktiviert, unabhängig davon, welche Konservierungsmethode zuvor angewandt wurde.

4.3.3 Immunzellen zeigen eine verringerte Migration zu IFC-Gewebe

Lösliche Faktoren, wie Zytokine und Chemokine, aber auch DAMPs, locken Immunzellen aus der Blutbahn in das Gewebe. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit das Migrationsverhalten von PMNs, Monozyten und T-Zellen durch konditioniertes Medium (KM) unterschiedlich konservierter Aortengewebe verändert wird (Abb. 25).

Die humanen Immunzellen wurden dazu in Diätmedium auf die Oberseite einer porösen Membran eines Chemotaxissystems gesät. Auf der gegenüberliegenden Seite im unteren Well diente konditioniertes Diätmedium von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe als Attractant. In der Negativkontrolle (NK) wurde Diätmedium verwendet, sodass hier kein chemotaktischer Gradient vorlag und die Anzahl migrierter Zellen der ungerichteten, zufälligen Zellmigration entsprach. Nach 3 h wurden die migrierten Immunzellen gezählt, wobei sowohl Zellen im unteren Well des Chemotaxissystems als auch die an der Membranunterseite haftenden Zellen erfasst wurden.

Von den untersuchten Immunzellen wiesen PMNs generell das größte Migrationspotential auf, T-Zellen zeigten hingegen kaum ein gerichtetes Migrationsverhalten (Abb. 25). Es migrierten signifikant mehr PMNs zum KM von CFC-Gewebe als zu dem von IFC-Gewebe oder der Negativkontrolle. Ebenso zeigten PMNs eine signifikant erhöhte Migration zum konditionierten Medium des GA-fixierten Gewebes verglichen zu IFC-Gewebe. Die Anzahl der migrierten PMNs zum IFC-Gewebe-KM entsprach in etwa der ungerichteten, zufälligen Migration der Negativkontrolle (Abb. 25A). Monozyten zeigten zwar prinzipiell ein geringeres Migrationspotential als PMNs, aber ein vergleichbares Reaktionsprofil, d.h. in einer starken Tendenz migrierten mehr Monozyten zum CFC-Gewebe-KM als zur Negativkontrolle. Außerdem wurden Monozyten signifikant stärker vom KM des CFC- und GA-fixierten Gewebes angelockt als von IFC-Gewebe-KM. Es migrierten sogar signifikant weniger Monozyten zum IFC-Gewebe als zur Negativkontrolle (Abb. 25B). Nur wenige T-Zellen migrierten gerichtet zu den KMs der Gewebe. Es zeigte sich zwar auch hier die Tendenz, dass

mehr T-Zellen von CFC- und GA-fixiertem Gewebe angelockt werden, als von IFC-Gewebe, jedoch erreichten die Werte keine statistische Signifikanz (Abb. 25C).

Neben den Aortengewebe-KMs dienten die humanen Zytokine IL-8, IL-6, MCP-1 und ein Mix dieser drei Zytokine als Attractant in den Kontrollansätzen (Abb. 25D-F). Zusätzlich diente das KM einer mit α CD3/CD28-stimulierten PBMC-Kultur als Positivkontrolle (PK). Diese Kontrollen stellten eine Möglichkeit zur Validierung des Chemotaxissystems dar.

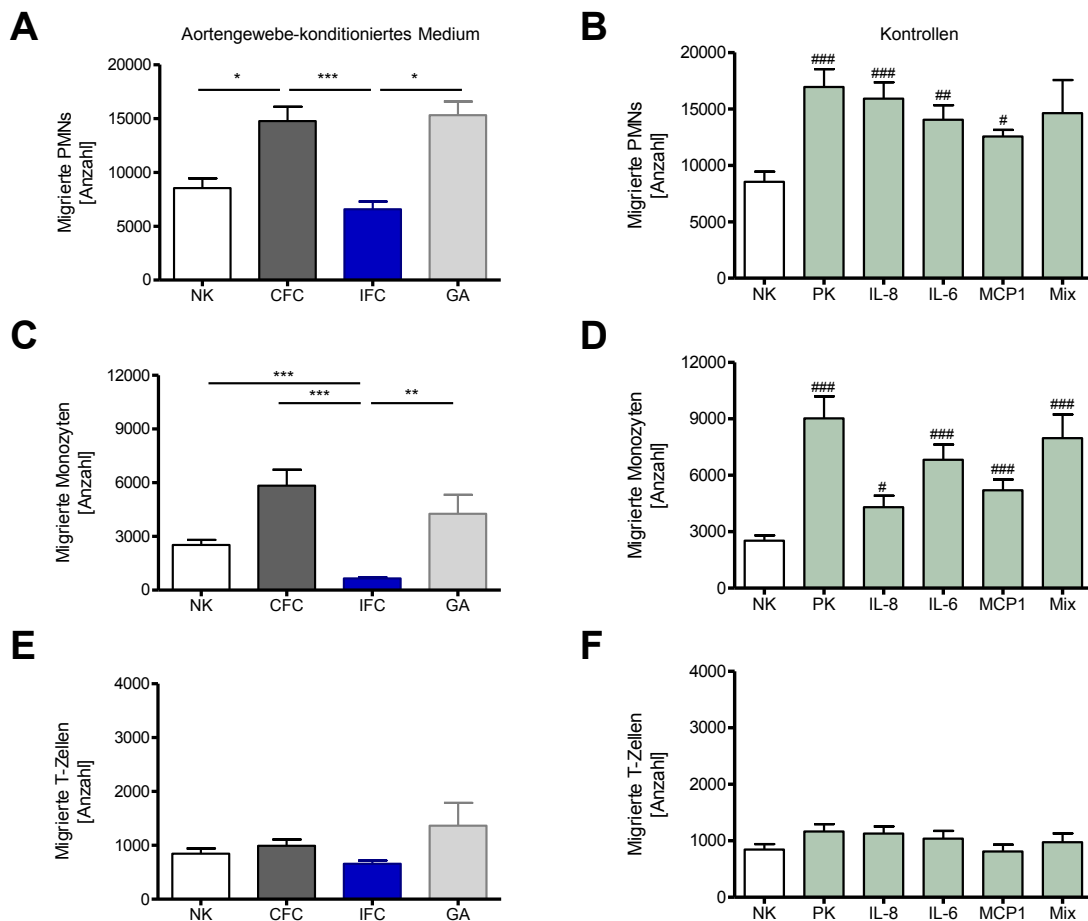


Abbildung 25: Migrationsverhalten humaner Immunzellen induziert durch lösliche Gewebefaktoren

PMNs, Monozyten (CD14⁺) und T-Zellen (CD3⁺) wurden aus humanem Frischblut isoliert. Jeweils 30.000 Zellen wurden in Diätmedium auf die Oberseite einer porösen Membran eines Chemotaxissystems gesät. Konditioniertes Diätmedium (KM) von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe diente als Attractant (A-C). Konditioniertes Medium einer mit α CD3/CD28-stimulierten PBMC-Kultur diente als Positivkontrolle (PK), Diätmedium allein als Negativkontrolle (NK). Zusätzlich wurden auch humanes IL-8, IL-6, MCP-1 und ein Gemisch dieser drei Zytokine (Mix) als weitere Kontrollen verwendet (D-F). Nach 3 h wurde die Anzahl migrierter PMNs (A+D), Monozyten (B+E) und T-Zellen (C+F) analysiert. Die Anzahl migrierter Zellen umfasst Zellen auf der Membranunterseite und Zellen im unteren Well. Die Werte (n=2-5, 3 Replikate pro Experiment) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanzen für das Aortengewebe-konditionierte Medium wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ermittelt. Die Signifikanzen bei den Kontrollen zwischen der NK und den jeweiligen Stimuli wurden durch den Mann-Whitney-Test mit # p < 0,05 ## p < 0,01, ### p < 0,001, bezogen auf die NK, ermittelt.

Für PMNs und Monozyten war jeweils die Positivkontrolle das stärkste Attractant. Weiterhin führten auch die Zytokine IL-8, IL-6 und MCP-1 zu einer signifikanten Induktion der von PMN- und Monozytenmigration. Keiner der Kontrollen induzierte hingegen eine signifikant erhöhte T-Zellmigration. Prinzipiell fiel auf, dass ein Zusammenspiel mehrerer löslicher Faktoren, wie sie in den Aortengewebe-KMs, der Positivkontrolle oder dem Zytokinmix vorhanden sind, eine stärkere Migration von Immunzellen hervorrief, als einzelne Faktoren.

Die Migration humaner Immunzellen wurde demzufolge von freigesetzten Faktoren des CFC- und GA-fixierten Aortengewebes induziert. Lösliche Faktoren des IFC-Gewebes lockten hingegen nicht mehr Immunzellen als die Negativkontrolle an.

4.3.4 Einfluss auf die Aktivierung humaner PMNs

4.3.4.1 Etablierung des PMN-Aktivierungs-Assays

PMNs (Granulozyten) bilden die erste Front der zellulären Immunantwort. Bei Infektionen, Gewebsschädigung oder Implantationen werden sie aus dem Blut ins Gewebe rekrutiert und aktiviert. Dabei beträgt die Lebenszeit der aktivierten PMNs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur einige Stunden. Dennoch ist diese Aktivierung entscheidend für den weiteren Verlauf der Immunantwort, da PMNs Zytokine und Chemokine zur Anlockung weiterer Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen, sezernieren. Um den Aktivierungsstatus von PMNs *in vitro* einschätzen zu können, war es zunächst Ziel, ein Panel für die Charakterisierung der Oberflächenmoleküle zu etablieren, da hierfür keine Kenntnis einer optimalen Markerkombination vorlag. Dazu wurden PMNs aus humanem Frischblut isoliert, sofort nach der Isolation in einer Zellkulturplatte ausgesät und mit den Aktivatoren LPS, TNF- α oder dem Tripeptid fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) stimuliert bzw. ohne weiteren Stimulus kultiviert. Nach 4 h erfolgte die Ernte und die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression (Zeitpunkt t_4). Die Expression der Oberflächenmarker auf den PMNs direkt nach der Isolation aus dem Blut wurde ebenfalls bestimmt (Zeitpunkt t_0).

Die PMNs (t_0 und t_4) exprimierten CD16b, die für Neutrophile spezifische Isoform des Fc γ -Rezeptors, das Integrin CD11b, die Membranproteine CD66b und CD63 sowie die Adhäsionsmoleküle CD43 und CD62L (Abb. 26A). Nach der vierstündigen Kulturdauer konnte bereits ein reduziertes Expressionsniveau der Adhäsionsmoleküle CD43 und CD62L auf den unstimulierten Zellen beobachtet werden. Aus diesem Grund erfolgte bei der Analyse der Oberflächenmarker nach vierstündiger Stimulation stets eine Normalisierung auf die

Expression der Marker (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) auf frisch isolierten t_0 -PMNs (Abb. 26B).

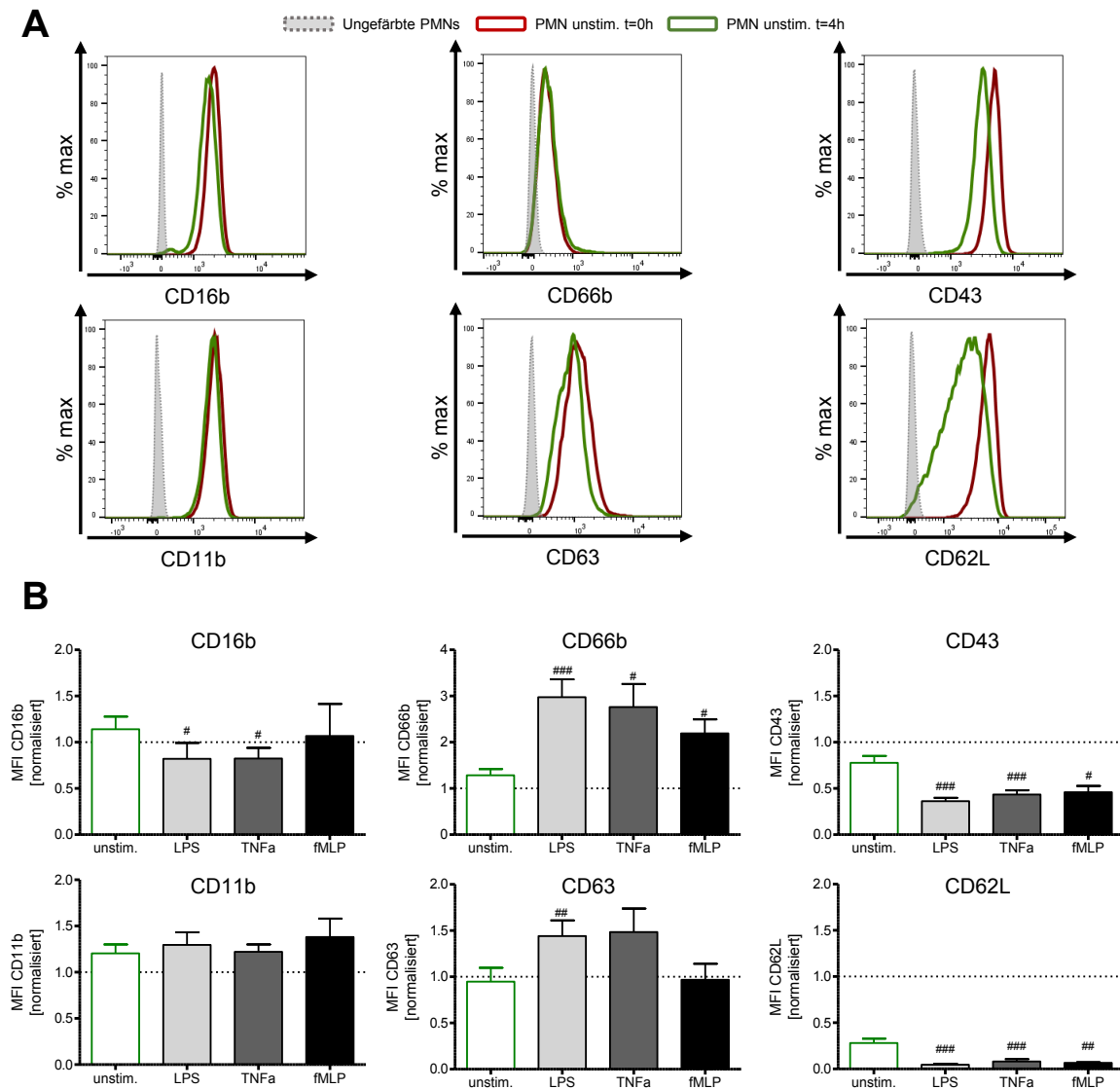


Abbildung 26: Expression der Oberflächenmarker von humanen PMNs nach Aktivierung

PMNs wurden aus Frischblut isoliert und sofort ($t=0h$) bzw. nach vierstündiger Kultur *in vitro* ($t=4h$) mit human-spezifischen Antikörpern für CD16b, CD11b, CD66b, CD63, CD43 und CD62L gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Repräsentative FACS-Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität der Marker für unstimulierte PMNs direkt nach der Isolation ($t=0h$, rote Kurve) sowie nach Kultivierung in der Zellkulturplatte ($t=4h$, grüne Kurve) im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (gestrichelte graue Kurve). **B)** PMNs wurden für 4 h mit LPS, TNF- α oder fMLP stimuliert bzw. ohne weiteren Stimulus kultiviert (unstim.). Die Oberflächenmarker wurden analysiert und die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind im Diagramm dargestellt. Die Werte ($n=6-14$) wurden dabei auf die unstimulierten PMNs zum Zeitpunkt t_0 normalisiert (=1, gestrichelte Linie). Die Signifikanzen zwischen den unstim. und stimulierten Zellen wurden durch den Mann-Whitney-Test mit # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ bezogen auf die unstim. Kontrolle ermittelt.

Die Aktivierung der PMNs für 4 h *in vitro* mit LPS oder TNF- α führte demnach zu einer signifikanten Verringerung der Expression der Oberflächenmarker CD16b, CD43 und CD62L sowie zu einer erhöhten CD66b und CD63-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 26B). Der PMN-Aktivator fMLP führte ebenfalls zu einer signifikanten Veränderung der CD66b-, CD43- und CD62L-Expression. LPS und TNF- α waren jedoch die am stärksten aktivierenden Faktoren für PMNs. Der Oberflächenmarker CD11b zeigte keine signifikante Veränderung durch die verschiedenen Aktivierungen.

Zusätzlich fand eine Analyse der sezernierten Zytokine und Chemokine der unstimulierten sowie der 4 h-stimulierten PMNs statt (Abb. 27). Mip1- β und IL-8 wurden von unstimulierten PMNs während der vierstündigen Kulturdauer auf einem basalen Niveau produziert. Durch die Stimulation mit LPS oder TNF- α , jedoch nicht durch fMLP, erhöhte sich die Konzentration von Mip1- β signifikant im konditionierten Medium (Abb. 27A). Die Sekretion von IL-8 wurde ebenfalls durch LPS signifikant, und durch TNF- α und fMLP in der Tendenz gesteigert (Abb. 27B). Unstimulierte PMNs produzierten kaum IL-6, jedoch führte eine Stimulation mit LPS zu einem starken Anstieg der IL-6-Sekretion (Abb. 27C). IL-15 hingegen wurde nur in sehr geringen Mengen von PMNs sezerniert und von diesen Zellen unter Aktivierungsbedingungen nur leicht verstärkt ausgeschüttet (Abb. 27D). Wie auch schon bei der Modulation der Oberflächenmoleküle ersichtlich wurde, führen vor allem LPS und TNF- α zu einem veränderten aktivierten Zytokinprofil der PMNs.

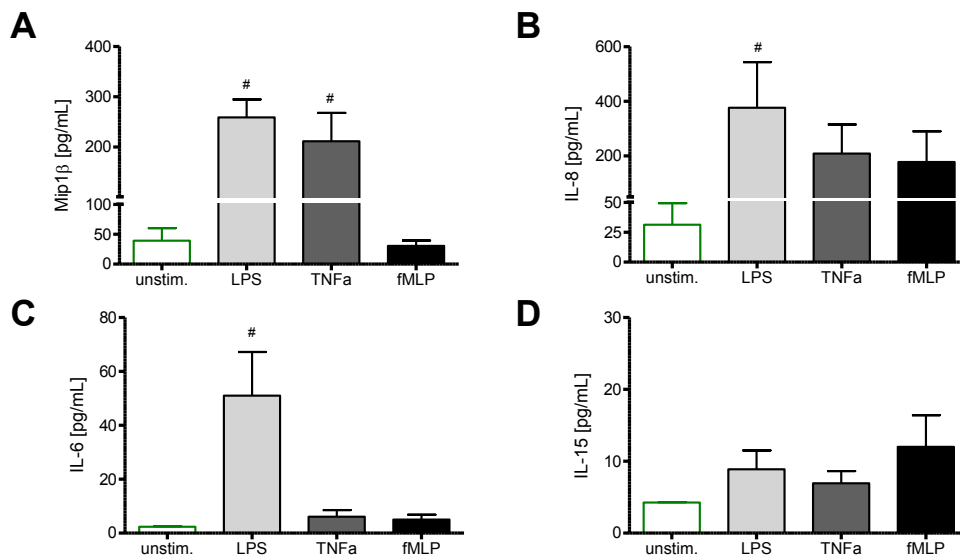


Abbildung 27: Freigesetzte Zytokine und Chemokine von humanen PMNs nach Aktivierung

PMNs wurden aus Frischblut isoliert und für 4 h mit LPS, TNF- α oder fMLP stimuliert bzw. ohne weiteren Stimulus kultiviert (unstim.). Die Konzentration von Mip1- β (A), IL-8 (B), IL-6 (C) und IL-15 (D) wurde in konditioniertem Medium der PMN-Kulturen mittels ELISA bestimmt. Die Werte (n=3-5) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanzen zwischen den unstim. und stimulierten Zellen wurden durch den Mann-Whitney-Test mit # $p < 0,05$, bezogen auf die unstim. Kontrolle, ermittelt.

Zusammenfassend konnte aus diesen Versuchen geschlussfolgert werden, dass die Regulation der Oberflächenmoleküle CD16b, CD66b, CD63, CD43 und CD62L sowie eine erhöhte Sekretion von Mip1- β , IL-6 und IL-8 gute Marker zur Charakterisierung aktivierter PMNs darstellen.

4.3.4.2 Die Methode zur Konservierung des Gewebes hat keinen Einfluss auf die PMN-Aktivierung

Nach der Etablierung geeigneter Marker zur Charakterisierung aktivierter PMNs (siehe Abschnitt 4.3.4.1), sollte nachfolgend untersucht werden, inwieweit unterschiedlich konservierte humane Aortengewebe einen Einfluss auf die Aktivierung humaner PMNs haben.

Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezielles Assay-Design für die Immunzell-Kokultur *in vitro* mit dem Aortengewebe entwickelt (Abb. 28). Um konkret den Einfluss der konservierten Gewebe auf die Immunzellen zu untersuchen, wurden die Zellen direkt auf dem Aortengewebe kultiviert.

Humane PMNs wurden dazu aus Frischblut isoliert und auf dem Gewebe ausgesät (Schema siehe Abb. 28A). Zuvor erfolgte mit Hilfe eines Silikonringes eine Fixierung der CFC-, IFC- oder GA-behandelten Aortengewebestücke am Boden des Zellkulturwells, wodurch der direkte Kontakt der PMNs mit der Gewebeoberfläche (Seite der Gefäßinnenwand, *Tunica intima*) sichergestellt wurde (Abb. 28B). Nach 4 h wurde das konditionierte Medium für nachfolgende Versuche mit Monozyten abgenommen (siehe Abschnitt 4.3.4.3) und die PMNs wurden vom Gewebe geerntet, um deren Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch zu analysieren. Es wurde ebenfalls stets die Expression der Oberflächenmoleküle der frisch isolierten PMNs (t_0) bestimmt. Eine Analyse der sezernierten Zytokine zur Bestimmung des PMN-Aktivierungsstatus in den PMN-Gewebe-Kokulturen erfolgte jedoch nicht, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass vom Aortengewebe selbst Zytokine und Chemokine freigesetzt werden (Abbildung 18 und 19) und demnach eine Diskriminierung der Herkunft der Zytokine nicht möglich ist.

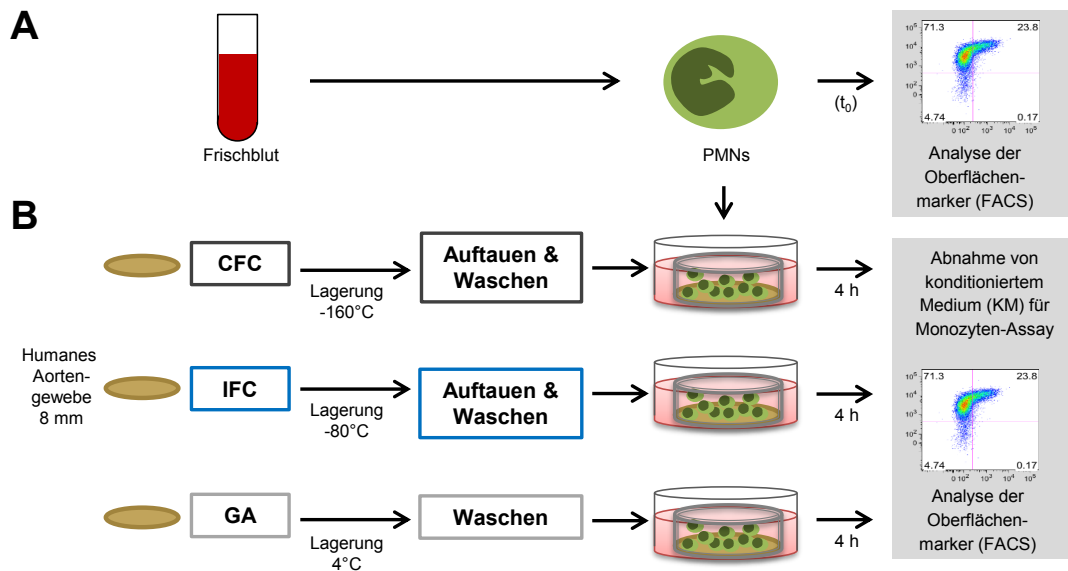


Abbildung 28: Experimentelles Design der PMN-Aktivierung auf humanem Aortengewebe

A) PMNs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Frischblut isoliert und auf der Seite der Gefäßinnenwand des Aortengewebes ausgesät. Außerdem erfolgte eine sofortige (t₀) Färbung und Analyse der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie (FACS). **B)** Die Aortengewebestücke wurden zuvor nach definierten Protokollen für CFC, IFC oder GA-Fixierung konserviert, entsprechend der Konservierungsmethode gelagert (-160 °C, -80 °C, 4 °C), aufgetaut bzw. gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium in eine Zellkulturplatte überführt. Mittels eines Silikonringes wurde das Aortengewebe am Boden des Zellkulturwells fixiert. Dies ermöglichte den direkten Kontakt der PMNs mit der Gewebeerfläche. Nach einer vierstündigen Kokultur wurde das konditionierte Medium für folgende Monozyten-Assays abgenommen, die PMNs geerntet und die Expression der Oberflächenmoleküle mittels FACS untersucht.

Die Analyse der Oberflächenmarker der PMNs zeigte, dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Marker auf den PMNs nach vierstündiger Kokultur auf unterschiedlich konserviertem Aortengewebe ergaben (Abb. 29). Es konnte dennoch eine in der Tendenz leichte Erhöhung des Aktivierungsmarkers CD66b auf PMNs nach Kultivierung auf Aortengewebe, im Vergleich zum Kontrollansatz auf der Zellkulturplatte (Ko), festgestellt werden, wobei GA-fixiertes Gewebe die stärkste Erhöhung der Expression hervorrief (Abb. 29D). Damit ging eine tendenzielle Verringerung der Expression der Aktivierungsmarker CD43 und CD62L auf den Gewebe-kokultivierten PMNs im Vergleich zur Kontrolle einher (Abb. 29E+F).

Es fand demnach eine generelle schwache Aktivierung der PMNs durch die Kultivierung auf Aortengewebe statt, jedoch hatte die Art der Konservierungsmethode des Gewebes keinen weiteren Einfluss auf den Aktivierungsstatus der PMNs.

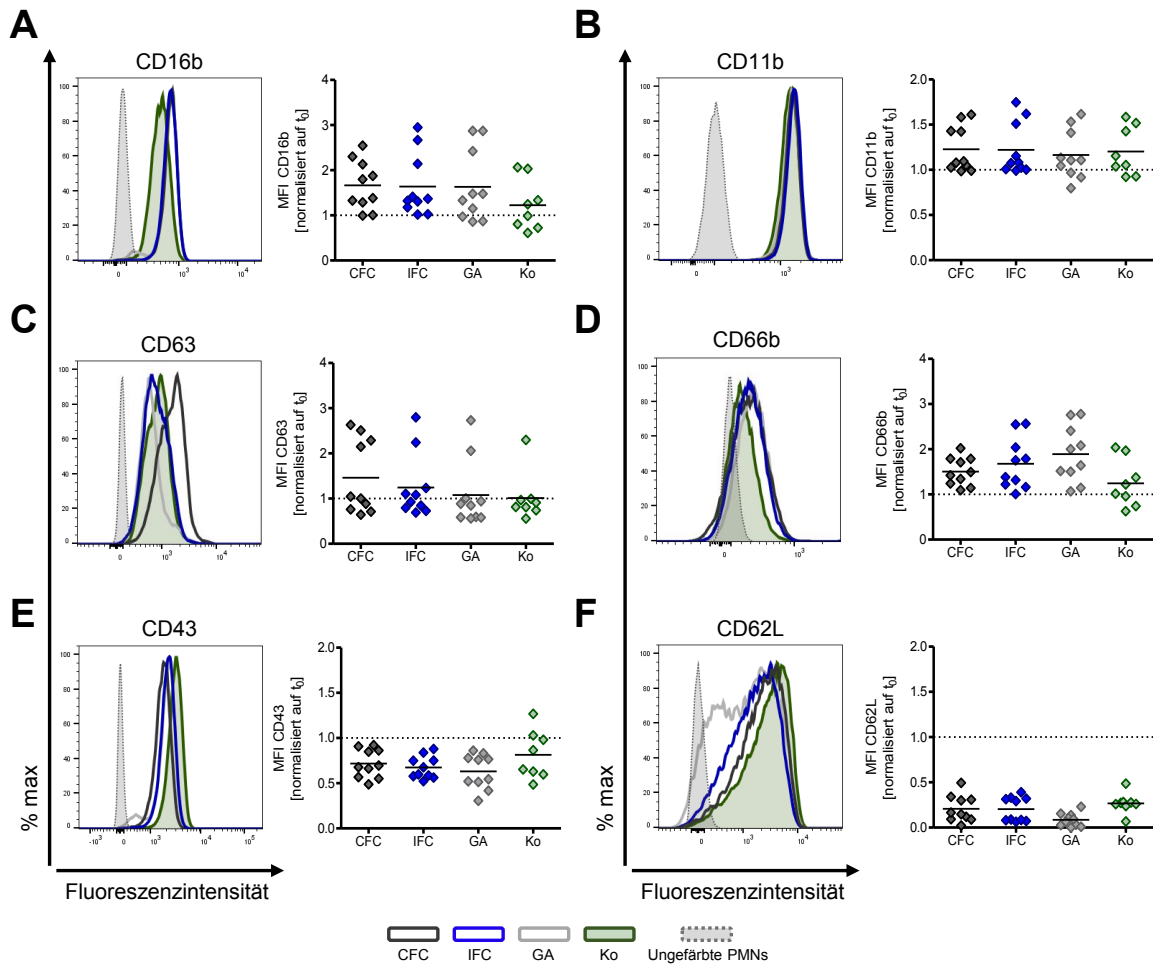


Abbildung 29: Expression der Aktivierungsmarker von PMNs nach Kokultur auf humanen Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

Frisch isolierte PMNs wurden für 4 h auf CFC-, IFC- oder GA-fixiertem Aortengewebe und parallel im Kontrollansatz (Ko) auf der Zellkulturplatte kultiviert. Anschließend wurden die PMNs geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD16b (A), CD11b (B), CD63 (C) sowie die Aktivierungsmarker CD66b (D) CD43 (E) und CD62L (F) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative FACS-Histogramme (links) zeigen die Fluoreszenzintensität der Marker für PMNs nach Kultivierung auf CFC-Gewebe (dunkelgraue Kurve), IFC-Gewebe (blaue Kurve), GA-fixiertem Gewebe (hellgraue Kurve) und der Ko (grüne gefüllte Kurve). Die graue gestrichelte Kurve bildet die ungefärbte Kontrolle ab. In einem zusammenfassenden Diagramm (rechts) sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt. Die Werte ($n=8-10$) des Zeitpunkts t_4 wurden dabei auf die unstimulierten PMNs zum Zeitpunkt t_0 normalisiert (=1, gestrichelte Linie), der Mittelwert ist als Linie gezeigt. Die statistische Testung mittels einseitiger Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test bzw. für CFC vs. IFC durch den Mann-Whitney-Test ergab keine Signifikanzen.

4.3.4.3 Charakterisierung des Monozytenphänotyps nach Stimulation mit löslichen Faktoren einer PMN-Gewebe-Kokultur

Wie zuvor beschrieben besteht, die Hauptaufgabe der PMNs nach der Extravasion ins Gewebe darin, Monozyten anzulocken und Makrophagen zu aktivieren. Die Monozyten und Makrophagen wiederum phagozytieren apoptotische PMNs und andere Zellen und initiieren weitere Schritte der Immunreaktion. Entsprechend der sezernierten Faktoren der umgebenden Zellen und dem Zustand der EZM kommt es so im weiteren Verlauf zur chronischen Entzündung, Wundheilung oder Fibrosierung.

Um die Interaktion der PMNs mit den Monozyten *in vitro* nachzustellen, wurde im folgenden Versuch die Beeinflussung der Monozyten durch sekretierte Faktoren der PMNs nach Kokultur auf dem Aortengewebe (siehe Abschnitt 4.3.4.2) untersucht. Dazu wurden humane Monozyten mit dem konditionierten Medium (KM) der vierstündigen PMN-Gewebe-Kokultur (PMN+Gewebe-KM) für 2 Tage kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden Monozyten mit 4-h-KM von unterschiedlich konserviertem Aortengewebe, ohne PMN-Kokultur, kultiviert (Ø Gewebe-KM), um den Einfluss der allein vom Gewebe sezernierten Faktoren von dem der PMNs abgrenzen zu können (Abb. 30A). Als Kontrolle wurden die Monozyten einerseits mit KM der auf der Zellkulturplatte kultivierten PMNs (Ko PMN-Gewebe-KM) und andererseits nur in Zellkulturmedium (Ko Ø Gewebe-KM) kultiviert.

Die Analyse der Oberflächenmarker ergab, dass sich die Expression des Monozytenmarkers CD14 (LPS-Rezeptor) im Vergleich zur Kontrolle (Ko) signifikant erhöhte, wenn die Monozyten entweder mit KM der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur oder mit KM des CFC-Gewebes allein kultiviert wurden (Abb. 30B). KM von IFC- oder GA-fixiertem Gewebe beeinflusste die CD14-Expression im Bezug auf die Kontrolle nicht, weder von der PMN-Kokultur- noch vom Ø Gewebe-Setting. Ein vergleichbares Muster war auch für den Fc γ -Rezeptor CD16 und den Scavenger-Rezeptor CD163 zu beobachten (Abb. 30C+D). Interessanterweise führte hierbei jedoch ausschließlich die Stimulation mit dem KM des Ø CFC-Gewebes zu einem signifikanten Anstieg der Markerexpression. Wenn zuvor PMNs auf dem CFC-Gewebe kokultiviert wurden, veränderte sich die CD16- oder CD163-Expression auf den Monozyten nicht. Dies spiegelte sich auch in der Analyse des prozentualen Anteils der CD14⁺⁺ CD16⁻ sowie der CD14⁺⁺ CD16⁺ Monozyten wider. Durch den Einfluss des Ø CFC-Gewebe-KM erhöhte sich der Anteil der CD14⁺⁺ CD16⁺ Fraktion stark im Vergleich zur Kontrolle, jedoch hatte das KM der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur keinen Einfluss auf die Verteilung der Monozytenfraktionen im Vergleich zur Kontrolle (Analyse nicht gezeigt).

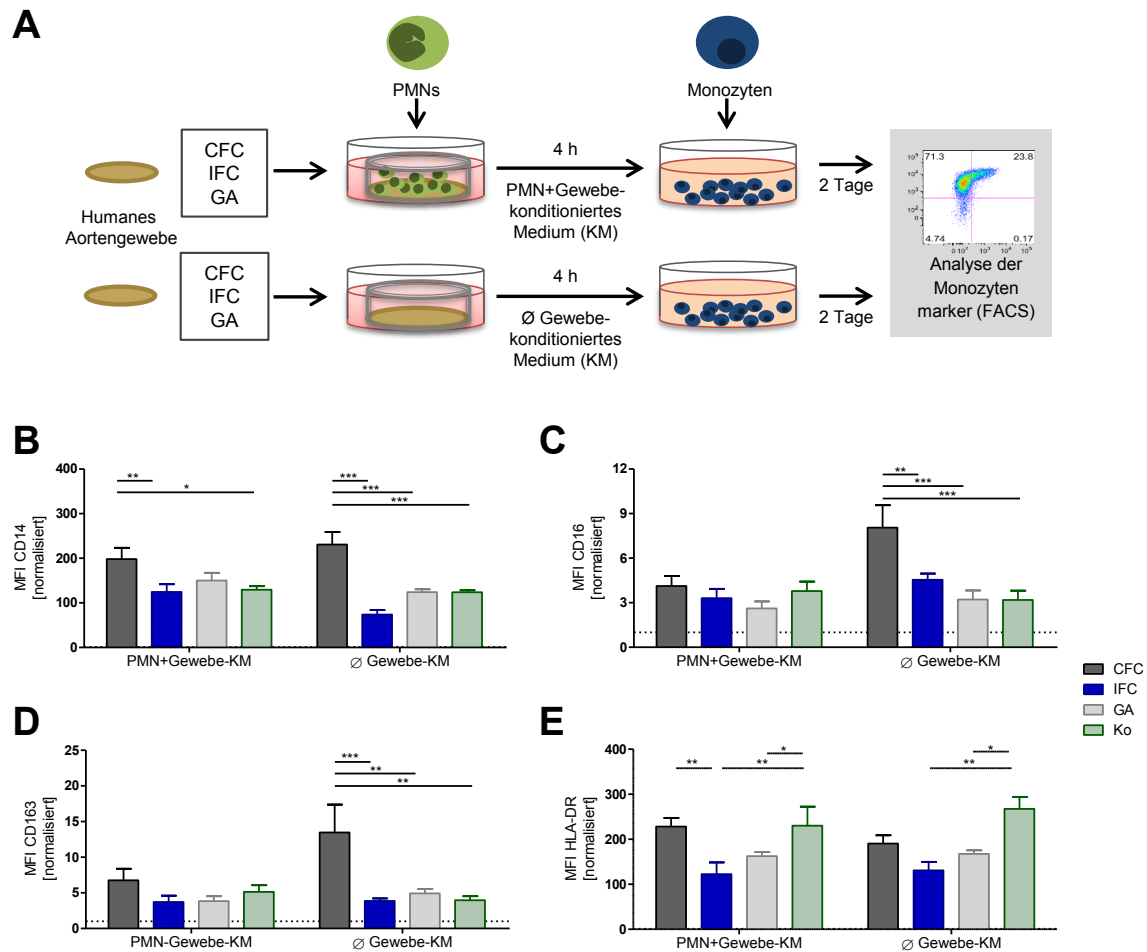


Abbildung 30: Einfluss löslicher Faktoren der PMN-Gewebe-Kokultur auf Monozyten

A) Von der vierstündigen PMN-Kokultur auf CFC-, IFC- oder GA-fixiertem Aortengewebe bzw. dem PMN-Kontrollansatz auf der Zellkulturplatte (Ko) (siehe Abschnitt 4.3.4.2) wurde konditioniertes Medium (KM) abgenommen und Monozyten wurden darin für 2 Tage kultiviert (PMN+Gewebe-KM). Parallel dazu wurden Monozyten mit KM von CFC-, IFC- oder GA-fixiertem Aortengewebe bzw. Zellkulturmedium (Ko) kultiviert (Ø Gewebe-KM). Die Monozyten wurden enzymatisch geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD14 (B), CD16 (C), CD163 (D) und HLA-DR (E) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für alle analysierten Marker. Die Werte (n=6) wurden auf die ungefärbte Kontrolle normalisiert (=1, gestrichelte Linie) und sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ermittelt.

Das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR zeigte eine signifikante Verringerung in der Expression auf Monozyten, sowohl durch eine Stimulation mit KM der PMN-IFC-Gewebe- und PMN-GA-Gewebe-Kokultur als auch mit dem KM des IFC- und GA-Gewebes allein. Auch im Vergleich zur Stimulation mit PMN-CFC-Gewebe-KM war die Expression von HLA-DR auf Monozyten, welche mit dem KM der PMN-IFC-Gewebe-Kokultur stimuliert wurden, signifikant reduziert (Abb. 30E).

Für alle auf den Monozyten untersuchten Marker war stets ein vergleichbares Expressionsniveau zwischen den beiden Kontroll-Settings zu verzeichnen (Kultivierung mit KM des PMN-Kontrollansatzes auf der Zellkulturplatte vs. Kultivierung mit Zellkulturmedium).

Es zeigte sich demnach, dass die löslichen Faktoren von unstimulierten PMNs (Ko) keinen Effekt auf den Phänotyp der Monozyten hatten. PMNs nach Kultivierung auf unterschiedlich konserviertem Aortengewebe hingegen sezernierten Faktoren, welche den Phänotyp von Monozyten partiell beeinflussen (vorrangig CD14 und HLA-DR). Jedoch hatte insbesondere das KM des CFC-Gewebes allein einen stärkeren Einfluss auf die Monozyten als das KM der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur (vgl. Marker CD16 und CD163). Dies deutet auf eine Art Gegenregulation zu den CFC-Gewebe-Faktoren durch die kokultivierten PMNs hin.

4.3.5 Einfluss auf die Polarisation humaner Makrophagen

4.3.5.1 Etablierung des Makrophagen-Polarisations-Assays

Makrophagen können durch biologisch aktive Faktoren aus der unmittelbaren Umgebung unterschiedlich polarisiert werden und je nach Stimulus einen eher pro-inflammatorischen M1-Phänotyp oder anti-inflammatorischen M2-Phänotyp annehmen.

Humane Monozyten (CD14⁺) wurden über 7 Tage mit Makrophagenkolonien-stimulierendem Faktor (engl.: *Macrophage-Colony Stimulating Factor*, M-CSF) zu Makrophagen differenziert und für weitere 2 Tage polarisiert. Eine Stimulation mit LPS und IFN- γ brachte den M1-Phänotyp hervor, eine Stimulation mit IL-4 bzw. mit IL-10 führte zu einem M2a- bzw. M2c-Phänotyp. Makrophagen ohne weiteren Polarisationsstimulus wurden als M0-Makrophagen bezeichnet. Wie in den lichtmikroskopischen Bildern der Makrophagenkulturen zu erkennen ist, war das Erscheinungsbild humaner Makrophagen *in vitro* sehr heterogen (Abb. 31).

Unter den M1-Makrophagen waren vermehrt elongierte, spindelförmige Zellen zu finden, hingegen zeigten M0- und M2-Makrophagen eher die typische „Spiegelei“-Form. Allein anhand der Morphologie war jedoch keine Zuordnung zu einer der Subgruppen der Makrophagen möglich. In der Literatur waren für polarisierte Makrophagen vielfältige Marker beschrieben, jedoch basierten diese meist auf mRNA-Expressionsdaten oder trafen nur für das murine System zu [123, 124, 158]. Ziel war es deshalb, ein Panel geeigneter Oberflächenmarker zu etablieren, um humane Makrophagen unterschiedlicher Polarisation mittels durchflusszytometrischer Verfahren charakterisieren zu können.

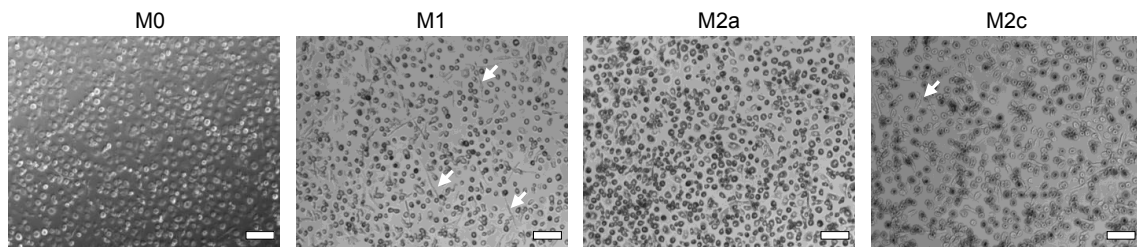


Abbildung 31: Morphologie polarisierter humaner Makrophagen *in vitro*

Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen polarisierter Makrophagen. Monozyten ($CD14^+$) wurden mit M-CSF für 7 Tage zu **M0**-Makrophagen differenziert. Eine Stimulation mit LPS und $IFN-\gamma$ führte zum **M1-Typ**, mit IL-4 bzw. IL-10 zum **M2a**- bzw. **M2c**-Typ. Weiße Pfeile zeigen auf elongierte Zellen (vor allem beim M1-Phänotyp zu beobachten). Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm .

Zur Charakterisierung der Makrophagen wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD16, CD163, CD206, CD80 und HLA-DR bestimmt (Abb. 32).

Im Verlauf des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu M0-Makrophagen verminderte sich die Expressionsdichte des LPS-Rezeptors und Monozyten/Makrophagenmarkers CD14 (Daten nicht gezeigt). Durch die anschließende Polarisation erniedrigte sich die CD14-Expression auf M2a-Makrophagen weiter, erhöhte sich jedoch auf M2c-Makrophagen leicht, wodurch sich ein signifikanter Unterschied in der CD14-Expression zwischen dem M2a- und M2c-Phänotyp ergab (Abb. 32A). Die Expression des Makrophagenmarkers CD16 (Fc γ -Rezeptor) verringerte sich ebenfalls leicht bei einer Polarisation zum M2a-Phänotyp (Abb. 32 B). M1-Makrophagen zeigten eine signifikante Hochregulierung des Kostimulationsmoleküls CD80 und des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR im Vergleich zu M0- und M2-Makrophagen (Abb. 32C+D). Der Mannoserezeptor CD206 war im Vergleich zu M1-Makrophagen bei M2a-Makrophagen signifikant erhöht (Abb. 32E). Für den Scavenger-Rezeptor CD163 war generell nur ein geringes Expressionsniveau mit einer im Trend leichten Erhöhung dieses Markers bei der M2c-Polarisation nachweisbar (Abb. 32F).

Neben den Oberflächenmarkern wurde außerdem die Zytokinproduktion unterschiedlich polarisierter humaner Makrophagen untersucht (Abb. 33). Eine TNF- α - und IL-6-Sekretion erfolgte lediglich durch M1-Makrophagen in signifikant erhöhten Konzentrationen gegenüber M0 bzw. M2-Makrophagen (Abb. 33A+B). MCP-1 wurde generell von Makrophagen in großen Mengen freigesetzt, aber auch hierbei zeigten M1-Makrophagen signifikant höhere Werte im Vergleich zum M0- und M2a-Phänotyp (Abb. 33C). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde ebenfalls von allen Makrophagen sezerniert, wobei auch hierbei M1-Makrophagen die signifikant höchsten Konzentrationen freisetzten (Abb. 33D). Für M2c-Makrophagen sind im Diagramm keine Werte aufgeführt, da IL-10 zur Polarisation genutzt wurde und somit bereits im Medium vorhanden war.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Etablierungsversuchen schlussfolgern, dass die Oberflächenmoleküle CD80 und HLA-DR sowie die Zytokine TNF- α , IL-6 und MCP-1 eindeutige Marker zur Charakterisierung des M1-Phänotyps darstellen. Eine erhöhte Expression des Oberflächenmoleküls CD206 zeigt eine Verschiebung zum M2a-Phänotyp an, wohingegen der Marker CD163 lediglich als schwacher M2c-Marker dienen kann.

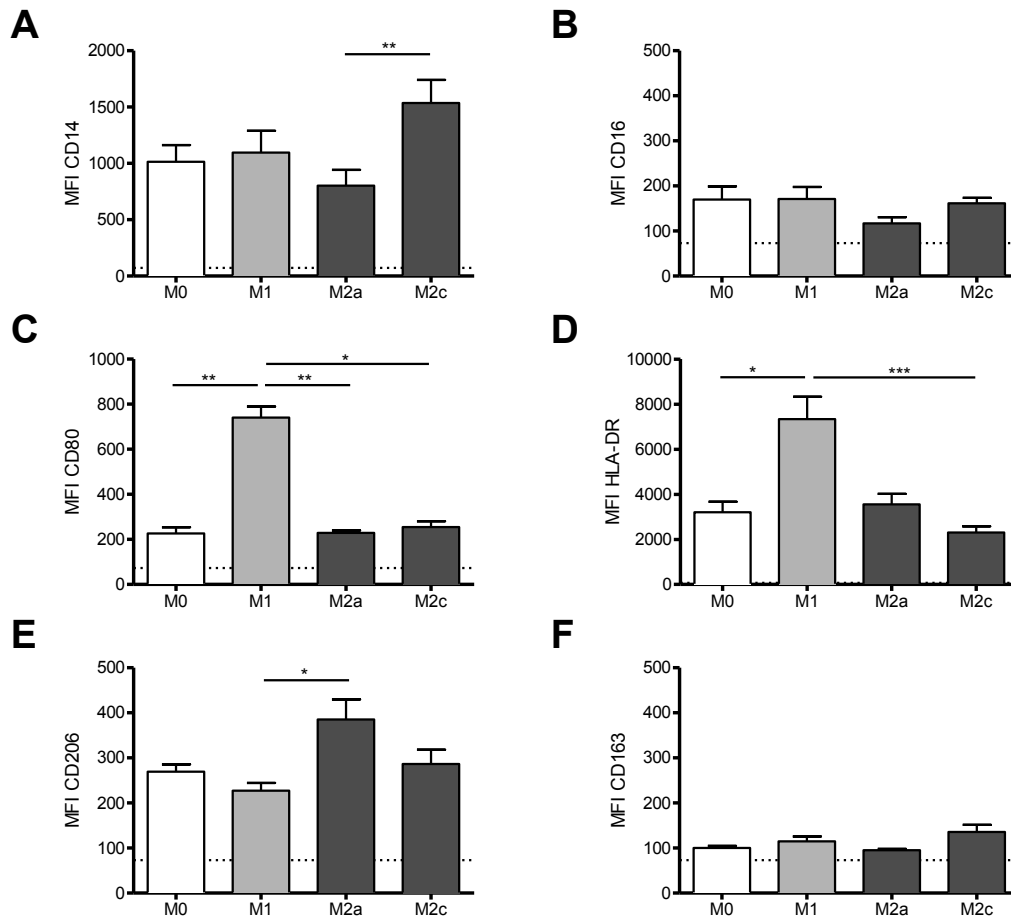


Abbildung 32: Expression der Oberflächenmarker von polarisierten humanen Makrophagen

Monozyten (CD14⁺) wurden mit M-CSF für 7 Tage zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte eine zweitägige Polarisation mit LPS und IFN- γ zum M1-Typ und mit IL-4 bzw. mit IL-10 zum M2a- bzw. M2c-Typ. Unstimulierte Makrophagen wurden als M0 bezeichnet. Nach einer enzymatischen Ernte folgte die Färbung mit human-spezifischen Antikörpern für CD14 (A), CD16 (B), die M1-Polarisationsmarker CD80 (C) und HLA-DR (D) sowie für die M2-Polarisationsmarker CD206 (E) und CD163 (F) und anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind als Mittelwert + SEM für n=7-10 Werte dargestellt. Die gestrichelte Linie entspricht dem MFI der ungefärbten Kontrolle. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ermittelt.

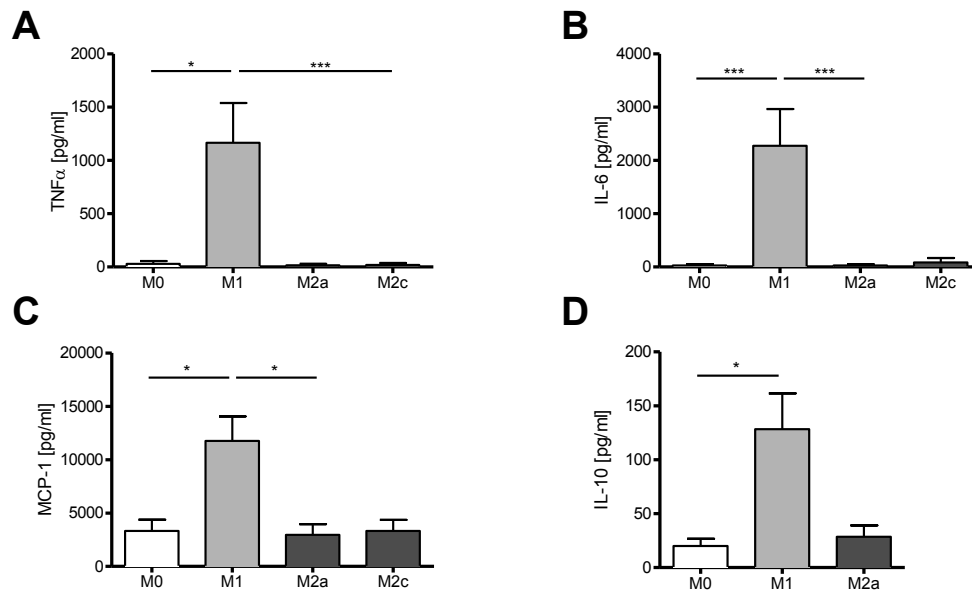


Abbildung 33: Freigesetzte Zytokine und Chemokine polarisierter humaner Makrophagen

Monozyten (CD14⁺) wurden mit M-CSF für 7 Tage zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte eine zweitägige Polarisation mit LPS und IFN- γ zum M1-Typ und mit IL-4 bzw. mit IL-10 zum M2a- bzw. M2c-Typ. Unstimulierte Makrophagen wurden als M0 bezeichnet. Die Konzentration von TNF- α (A), IL-6 (B), MCP-1 (C) und IL-10 (D) wurde im konditionierten Medium der Kulturen mittels ELISA bestimmt. Die Werte (n=2-10) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, ***p < 0,001 ermittelt.

4.3.5.2 CFC und IFC verhindern eine M1-Polarisation

Auf Grundlage der Etablierung geeigneter Marker zur Einschätzung des Makrophagenphänotyps (siehe Abschnitt 4.3.5.1) wurde der Einfluss der Konservierungsmethode humaner Aortengewebe auf die Makrophagenpolarisation untersucht. Das im Rahmen der Arbeit neu entwickelte experimentelle Design der Untersuchungen ist Abb. 34 zu entnehmen. Humane Monozyten (CD14⁺) wurden 7 Tage mit M-CSF zu Makrophagen differenziert und weitere 2 Tage zur Polarisation auf humanem Aortengewebe kultiviert (Abb. 34A). Es erfolgte eine Fixierung der CFC-, IFC- oder GA-fixierten Aortengewebestücke am Boden des Zellkulturwells mit Hilfe eines Silikonringes, wodurch der direkte Kontakt der Makrophagen mit der Gewebeoberfläche (Seite der Gefäßinnenwand, *Tunica intima*) gewährleistet wurde (Abb. 34B). Abschließend wurden die phänotypischen Eigenschaften der Makrophagen auf den unterschiedlich konservierten Aortengeweben durch eine elektronenmikroskopische und durchflusszytometrische Analyse bestimmt. Wie auch schon als Limitation bei den Kokultur-Experimenten von PMNs auf Aortengewebe begründet (siehe Seite 77), erfolgte keine Analyse der sezernierten Zytokine in der Makrophagen-Gewebe-Kokultur zur Charakterisierung des Makrophagenphänotyps, da eine Unterscheidung der "Makrophagenzytokine" von den "Gewebezytokinen" in diesem Assay nicht möglich ist.

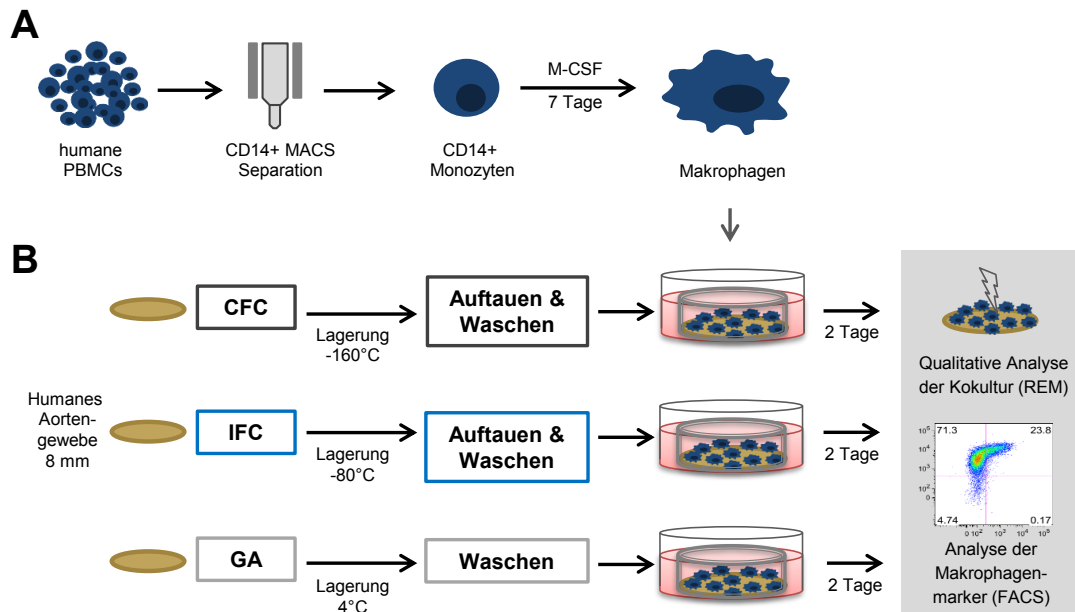


Abbildung 34: Experimentelles Design der Makrophagen-Polarisation auf humanem Aortengewebe

A) Monozyten ($CD14^+$) wurden mittels magnetischer Separation (MACS) aus humanen PBMCs isoliert, anschließend durch M-CSF Stimulation für 7 Tage zu Makrophagen in vitro differenziert und auf der Seite der Gefäßinnenwand des Aortengewebes ausgesät. **B)** Die Aortengewebebestücke wurden zuvor nach definierten Protokollen für CFC, IFC oder GA-Fixierung konserviert, entsprechend der Konservierungsmethode gelagert (-160°C , -80°C , 4°C), aufgetaut bzw. gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium in eine Zellkulturplatte überführt. Mittels eines Silikonringes wurde das Aortengewebe am Boden des Zellkulturwells fixiert. Dies ermöglichte den direkten Kontakt der Makrophagen mit der Gewebeoberfläche. Nach einer zweitägigen Kocultivierung wurden die Gewebebestücke mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert bzw. die Makrophagen geerntet und die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht.

Die elektronenmikroskopische Analyse der Makrophagen-Gewebe-Kocultivierung ergab, dass humane Makrophagen auf CFC- und IFC-Aortengewebe in vergleichbarer Quantität und Qualität adhäreren (Abb. 35A-D, schwarze Pfeile). Es ist außerdem zu erkennen, dass die Oberflächenstruktur des Aortengewebes (Gefäßinnenwand) bei beiden Kryokonservierungsmethoden gut erhalten blieb, hingegen das Aortengewebe durch GA-Fixierung strukturell verändert war (Abb. 35E). Ebenso wirkte die Morphologie der Makrophagen auf GA-fixiertem Gewebe unphysiologisch im Vergleich zu CFC- oder IFC-Gewebe (Abb. 35F). Die Makrophagen auf GA-fixiertem Gewebe zeigten nicht die typische Zellform mit langen Filopodien und wirkten abgerundeter und geschrumpft im Vergleich zu den Makrophagen auf kryokonservierten Geweben oder der Zellkulturplatte.

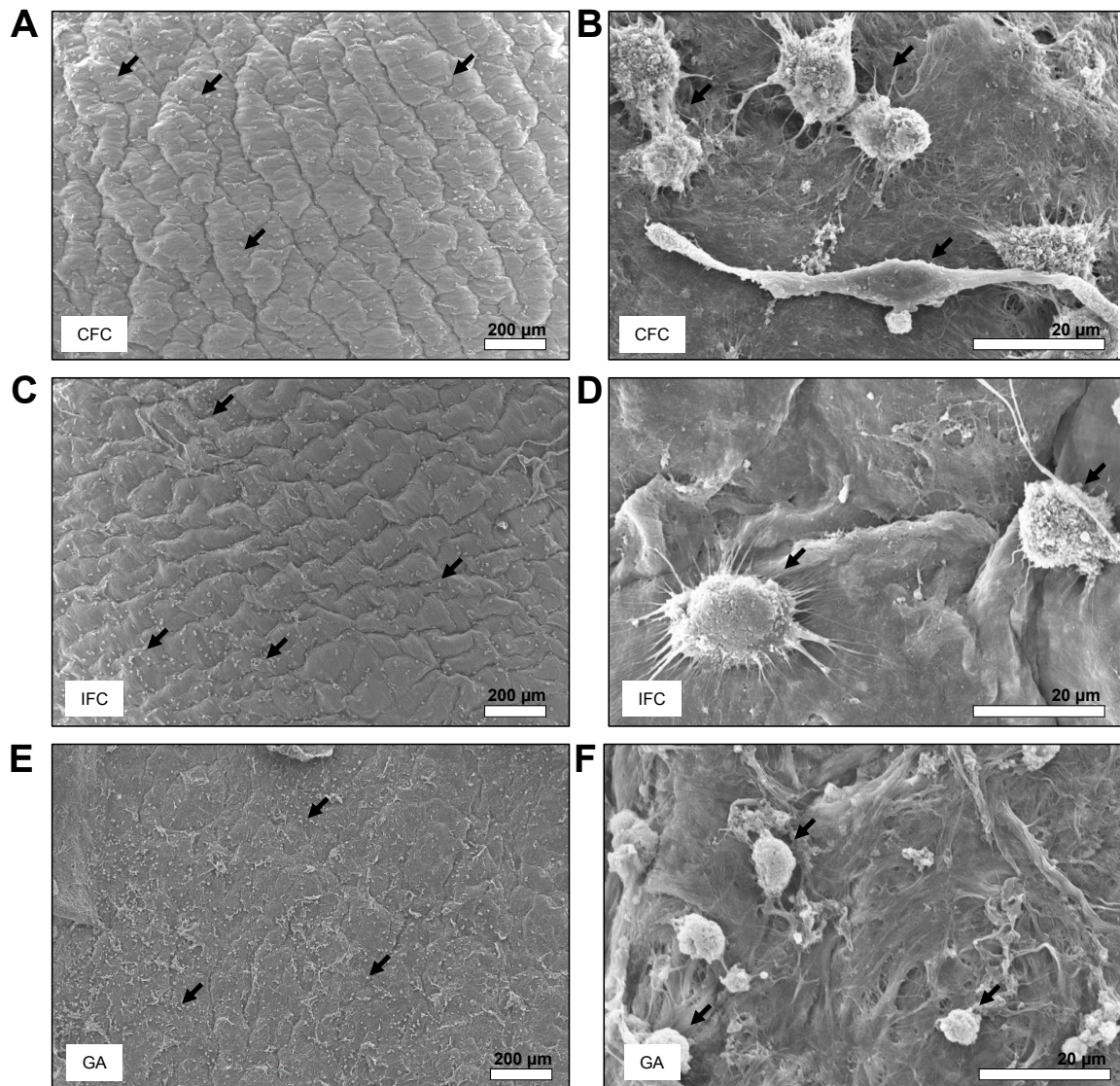


Abbildung 35: Qualitative morphologische Untersuchung der Makrophagen nach Kokultur auf humanem Aortengewebe mittels Rasterelektronenmikroskopie

Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen humane, adhärente Monozyten-abgeleitete Makrophagen (schwarze Pfeile) nach zweitägiger Kokultur auf der Gefäßinnenseite humaner CFC- (A+B), IFC- (C+D) und GA-fixierter (E+F) Aortengewebe. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 µm (A, C, E) bzw. 20 µm (B, D, F).

Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle ermöglichte eine spezifischere Charakterisierung des Makrophagenphänotyps. Zusätzlich zur Kultivierung auf dem CFC-, IFC- und GA-fixierten Aortengewebe wurden die Makrophagen parallel als Kontrolle (Ko) auf der Zellkulturplatte kultiviert.

Generell regulierten Makrophagen, welche auf dem Aortengewebe kultiviert wurden, den Makrophagenmarker CD14 im Vergleich zur Kontrolle hoch. Diese Erhöhung war für Makrophagen nach Kultivierung auf CFC-Gewebe signifikant (Abb. 36A). Interessanterweise exprimierten Makrophagen nach Kultivierung sowohl auf CFC-als auch auf IFC-Gewebe den Fc γ -Rezeptor CD16 signifikant verstärkt im Vergleich zur Kultivierung auf GA-Gewebe. Vor allem zeigten auf IFC-Gewebe kokultivierte Makrophagen eine gesteigerte CD16-Expression (Abb. 36B).

Das Expressionsniveau der M1-Polarisationsmarker CD80 und HLA-DR auf den Makrophagen veränderte sich nicht durch die Kultivierung auf CFC- oder IFC-Gewebe, jedoch erhöhte GA-fixiertes Gewebe tendenziell die HLA-DR-Expression auf den kokultivierten Makrophagen (Abb. 36C+D). Die Expression des M2-Polarisationsmarkers CD206 stieg bei Makrophagen nach Kultivierung auf CFC- oder IFC-Gewebe an und erniedrigte sich durch die Kultivierung auf GA-fixiertem Gewebe im Vergleich zur Kontrolle. Dadurch ergab sich ein signifikanter Unterschied in der CD206-Expression auf Makrophagen nach Kultivierung auf Aortengewebe beider Kryokonservierungsmethoden gegenüber GA-fixiertem Gewebe (Abb. 36E). Ebenso verringerte sich die Expression des M2-Markers CD163 auf Makrophagen, welche auf GA-fixiertem Gewebe kultiviert wurden, im Vergleich zu denen auf CFC-Gewebe und der Kontrolle (Abb. 36F).

Da die Makrophagen grundsätzlich alle der untersuchten Polarisationsmarker in unterschiedlicher Stärke konstitutiv exprimierten, ist vor allem das Verhältnis der Markerexpression von entscheidender Bedeutung, um eine Aussage zum vorherrschenden Makrophagenphänotyp zu treffen. Aus diesem Grund wurde die Expression des M1-Markers CD80 in Relation zum M2-Marker CD206 gesetzt. Hierbei zeigte sich, dass eine GA-Fixierung des Gewebes zu einer Verschiebung in Richtung einer M1-Polarisation der Makrophagen führt, CFC- und IFC-Gewebe hingegen einen Trend zur M2-Polarisation aufzeigen (Abb. 36G).

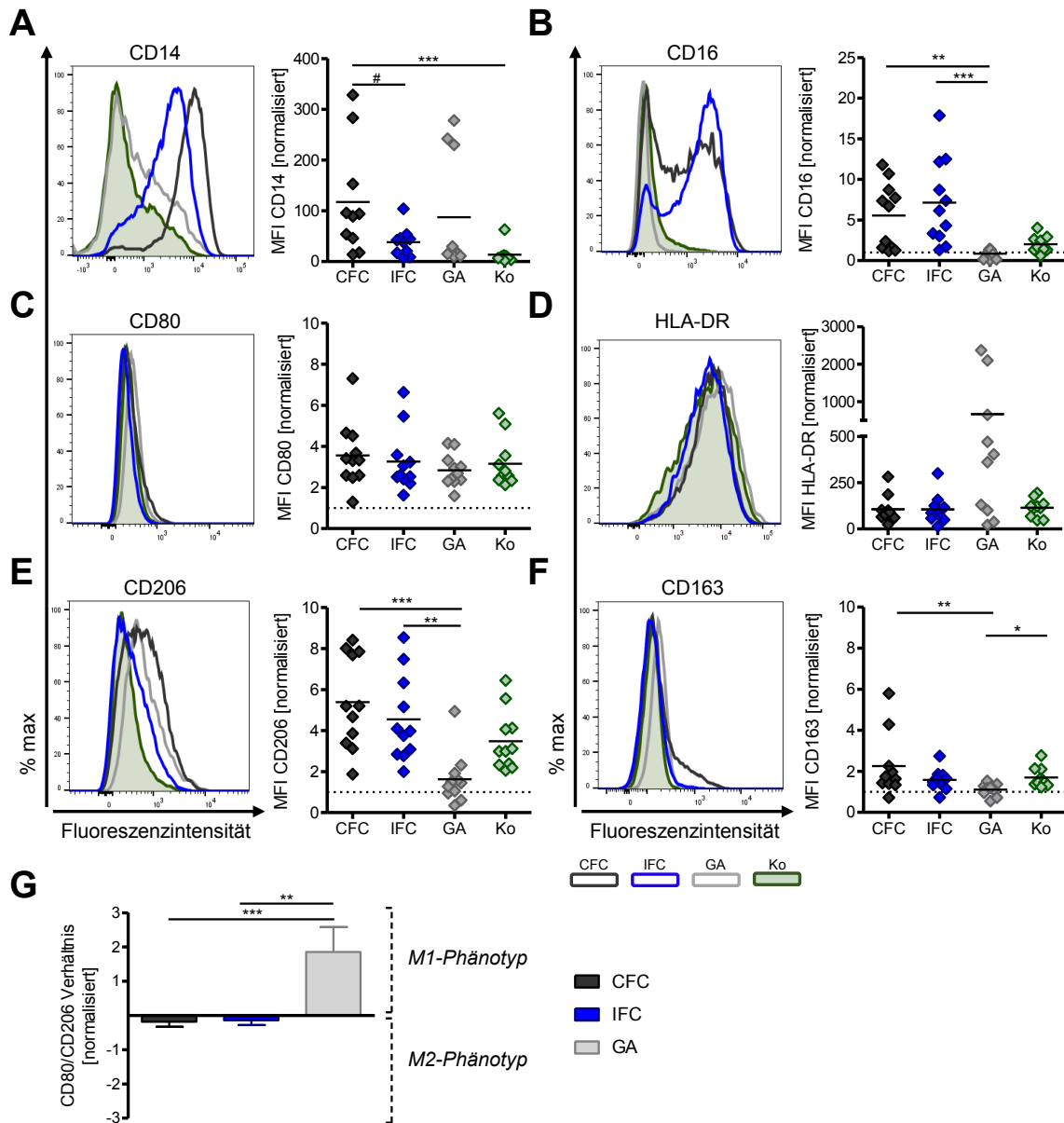


Abbildung 36: Expression der Polarisationsmarker von Makrophagen nach Kokultur auf humanen Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

Makrophagen wurden für 2 Tage auf CFC-, IFC- oder GA-fixiertem Aortengewebe und parallel im Kontrollansatz (Ko) auf der Zellkulturplatte kultiviert. Anschließend wurden die Makrophagen enzymatisch geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD14 (A), CD16 (B), die M1-Polarisationsmarker CD80 (C) und HLA-DR (D) sowie für die M2-Polarisationsmarker CD206 (E) und CD163 (F) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative FACS-Histogramme (links) zeigen die Fluoreszenzintensität der Marker für Makrophagen nach Kultivierung auf CFC-Gewebe (dunkelgrau Kurve), IFC-Gewebe (blaue Kurve), GA-fixiertem Gewebe (hellgraue Kurve) und Ko (grüne gefüllte Kurve). In einem zusammenfassenden Diagramm (rechts) sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt. Die Werte (n=10-11) wurden auf die ungefärbte Kontrolle normalisiert (=1, gestrichelte Linie), der Mittelwert ist als Linie gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ bzw. für CFC vs. IFC durch den Mann-Whitney-Test mit # $p < 0,05$ ermittelt. G) Das Verhältnis der MFI-Werte von CD80 zu CD206 ist dargestellt, wobei die MFIs hierbei auf die Ko normalisiert wurden (=0). Werte im positiven Bereich zeigen eine Verschiebung in Richtung einer M1-Polarisation, Werte im negativen Bereich in Richtung einer M2-Polarisation an. Die Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) mit ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ermittelt.

4.3.5.3 Die Makrophagenpolarisation wird stärker durch direkten Gewebekontakt als durch lösliche Faktoren beeinflusst

In einem weiterführenden Experiment sollte untersucht werden, inwieweit lösliche Faktoren aus dem konservierten Aortengewebe einen Einfluss auf die Makrophagenpolarisation haben. Dazu wurden die Makrophagen auf der Zellkulturplatte kultiviert und mit konditioniertem Medium (KM) von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe stimuliert. Wieder erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Expression der Oberflächenmoleküle nach 2 Tagen.

Ähnlich wie für die Kultur auf dem Gewebe konnte eine Tendenz zur erhöhten CD14-Expression auf Makrophagen, welche mit CFC-KM stimuliert wurden, beobachtet werden (Abb. 37A). Jedoch veränderte sich, im Gegensatz zu den auf Gewebe kultivierten Makrophagen, die CD16-Expression unter keiner der getesteten KM-Varianten (Abb. 37B). Die M1-Marker (CD80, HLA-DR) und M2-Marker (CD206, CD163) zeigten ebenfalls kaum Unterschiede im Expressionsniveau nach Stimulationen mit allen untersuchten KM-Varianten (Abb. 37C-F). Tendenziell verringerte sich lediglich die HLA-DR-Expression bei CFC-KM-stimulierten Makrophagen.

Das Verhältnis des M1-Markers CD80 zum M2-Marker CD206 zeigte, analog zur Makrophagenkultur auf dem Gewebe, eine leichte Verschiebung in Richtung einer M1-Polarisation für Makrophagen, welche mit KM von GA-fixiertem Gewebe stimuliert wurden. Makrophagen unter CFC-KM und IFC-KM-Stimulation wiesen hingegen einen Trend zur M2-Polarisation auf, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 37G). Grundsätzlich war die Beeinflussung des Makrophagenphänotyps durch lösliche Gewebefaktoren schwächer als die durch direkten Kontakt mit dem Aortengewebe (vorangegangenes Experiment siehe Abb. 36).

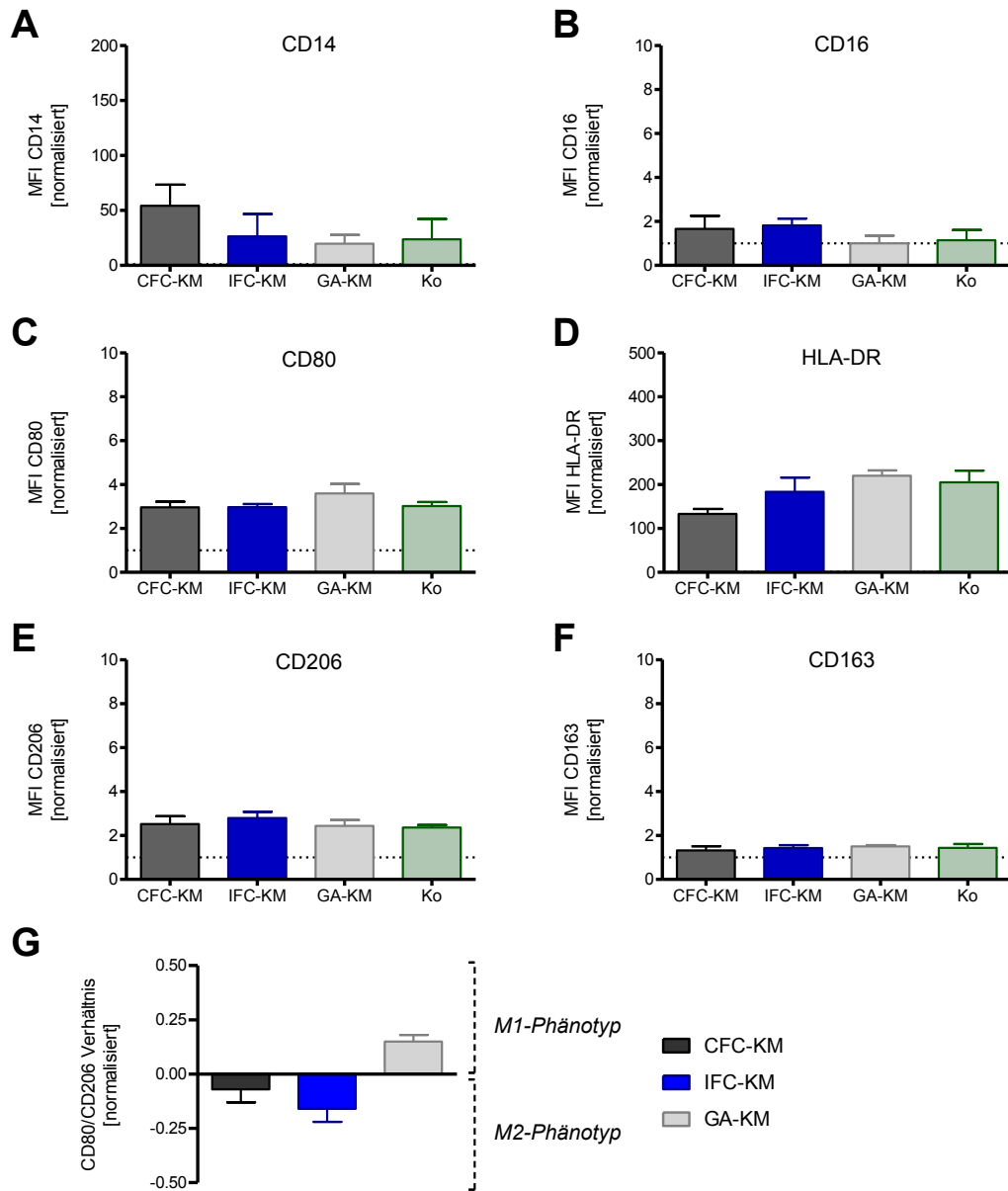


Abbildung 37: Expression der Polarisationsmarker von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium von humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung

Nach einer 6-tägigen Kultur von CFC-, IFC- und GA-fixiertem Aortengewebe wurde das konditionierte Medium (KM) gewonnen. Makrophagen wurden für 2 Tage mit dem jeweiligen KM stimuliert. Parallel wurden unstimulierte Makrophagen im Kontrollansatz (Ko) kultiviert. Anschließend wurden die Makrophagen enzymatisch geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD14 (A) und CD16 (B), die M1-Polarisationsmarker CD80 (C) und HLA-DR (D) sowie für die M2-Polarisationsmarker CD206 (E) und CD163 (F) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI). Die Werte (n=2) wurden auf die ungefärbte Kontrolle normalisiert (=1, gestrichelte Linie), der Mittelwert + SEM ist gezeigt. Eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) ergab keine Signifikanzen. Das Verhältnis der MFI-Werte von CD80 zu CD206 ist in (G) dargestellt, wobei die MFIs hierbei auf die Ko normalisiert wurden (=0). Werte im positiven Bereich zeigen eine Verschiebung in Richtung einer M1-Polarisation, Werte im negativen Bereich in Richtung einer M2-Polarisation an. Die Werte sind als Mittelwert + SEM gezeigt.

4.3.5.4 Mechanistische Untersuchungen zur TGF- β -Wirkung

Der Fokus der Arbeit lag auf dem Vergleich des Einflusses der beiden Kryokonservierungsmethoden auf die Immunogenität des Aortengewebes. Bezüglich der Makrophagenpolarisation konnten hierbei keine nennenswerten Unterschiede zwischen CFC und IFC aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 4.3.5.2). Den generellen Phänotyp der Makrophagen betrachtend, konnte hingegen eine verstärkte Expression der Marker CD14 und CD16 bei der Kultivierung auf kryokonserviertem Aortengewebe beobachtet werden (siehe Abb. 36). Zusätzlich ergaben vorherige Analysen, dass IFC-Aortengewebe mehr aktives TGF- β 1 freisetzt als CFC-Gewebe (siehe Abb. 20). Interessanterweise finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass die Moleküle CD14 und CD16 auf Makrophagen durch TGF- β reguliert werden [137]. Ziel des folgenden Versuches war es daher, zu überprüfen, ob die erhöhte CD16- bzw. CD14-Expression auf Makrophagen nach Kultivierung auf kryokonserviertem Aortengewebe durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers (nAK) gegen TGF- β 1 moduliert werden kann. Insbesondere sollte dabei geklärt werden, ob das aktive TGF- β 1 aus dem IFC-Aortengewebe für die signifikant erhöhte CD16-Expression der kokultivierten Makrophagen verantwortlich ist. In Abb. 38 ist die Markerexpression der Makrophagen nach Kultivierung auf CFC- und IFC-Aortengewebe sowie auf der Zellkulturplatte (Ko) jeweils mit und ohne Zugabe des TGF- β -nAK abgebildet. In den genannten Kokulturen konnte jedoch unter dem Einfluss des TGF- β -nAK keine signifikante Veränderung der CD14- oder CD16-Expression nachgewiesen werden.

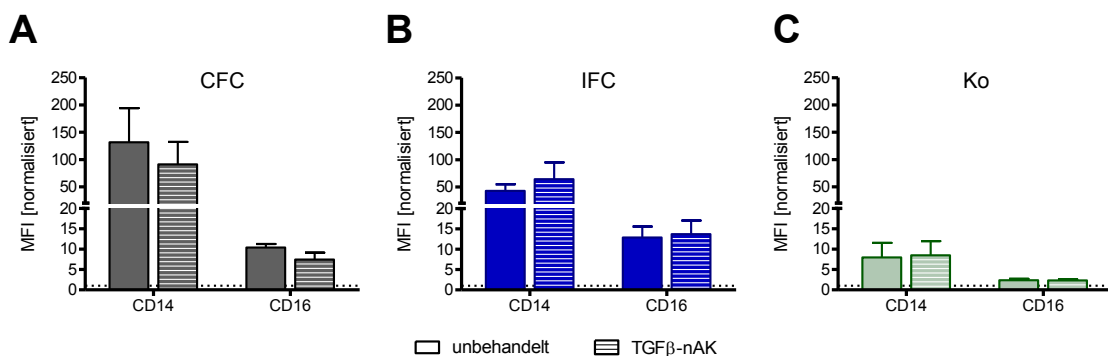


Abbildung 38: Expression der Makrophagenmarker CD14 und CD16 nach Kokultur auf humanem CFC- und IFC-Aortengewebe unter Inhibition von TGF- β 1

Makrophagen wurden für 2 Tage auf CFC- (A) oder IFC-Aortengewebe (B) und parallel im Kontrollansatz (Ko) auf der Zellkulturplatte (C) kultiviert. Neben der unbehandelten Kultur (ausgefüllte Balken) erfolgte eine Behandlung mit einem neutralisierenden Antikörper gegen TGF- β 1 (TGF- β -nAK, quergestrichelte Balken). Anschließend wurden die Makrophagen enzymatisch geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für CD14 und CD16 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Werte ($n=3$) wurden auf die ungefärbte Kontrolle normalisiert ($=1$, gestrichelte Linie), der Mittelwert + SEM ist gezeigt. Eine statistische Testung mittels Mann-Whitney-Test ergab keine Signifikanzen zwischen den unbehandelten und TGF- β -nAK-behandelten Kokulturen.

Im Trend zeigten Makrophagen in der CFC-Gewebe-Kokultur, welche mit dem TGF- β -nAK behandelt wurden, eine leicht erniedrigte Expression sowohl von CD14 als auch von CD16 (Abb. 38A). Die CD14-Expression erhöhte sich hingegen minimal bei Makrophagen nach Kultivierung auf IFC-Gewebe (Abb. 38B). Es zeigte sich außerdem, dass die Behandlung mit dem TGF- β -nAK prinzipiell keinen Einfluss auf Makrophagen hatte, welche als Kontrollansatz auf der Zellkulturplatte kultiviert wurden (Abb. 38C).

Die Zugabe des neutralisierenden Antikörpers gegen TGF- β 1 beeinflusste die Regulation von CD14 und CD16 auf Makrophagen nach Kokultur mit kryokonserviertem Aortengewebe nicht. Durch diesen Versuch konnte demnach kein Nachweis über den direkten Zusammenhang zwischen der erhöhten Freisetzung an aktivem TGF- β 1 aus dem IFC-Gewebe und der beobachteten erhöhten CD16-Expression erbracht werden.

4.3.6 Einfluss auf die Aktivierung humaner T-Zellen

4.3.6.1 Lösliche Faktoren des CFC-Gewebes verstärken die Proliferation

Zur Abschätzung der adaptiven Immunantwort fand eine Analyse des Proliferationsverhaltens humaner T-Zellen statt. Es sollte herausgefunden werden, inwieweit lösliche Faktoren des kryokonservierten Aortengewebes eine T-Zell-Antwort induzieren bzw. modulieren können. CFSE-gefärbte PBMCs wurden dazu für 4 Tage mit konditioniertem Medium (KM) von CFC- und IFC-Gewebe oder als Kontrolle (Ko) mit Zellkulturmedium inkubiert. Die Proliferationsrate der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnte dann anhand der Abschwächung des CFSE-Fluoreszenzsignals bestimmt werden (Abb. 39). Die Experimente zur Untersuchung der Induktion der Proliferation wurden ohne zusätzliche Aktivierung durchgeführt. Bei den Experimenten zur Analyse der Modulation der Immunzellproliferation erfolgte, zusätzlich zur Stimulation mit dem KM, eine basale Aktivierung mit einem α CD3-Antikörper.

Wie in Abb. 40 zu erkennen ist, führte weder die Stimulation mit KM vom CFC- noch vom IFC-Gewebe zu einer Induktion der T-Zellproliferation (Abb. 40A+B). Lediglich im Kontrollansatz war durch die Stimulation mit α CD3 eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Ko) zu verzeichnen.

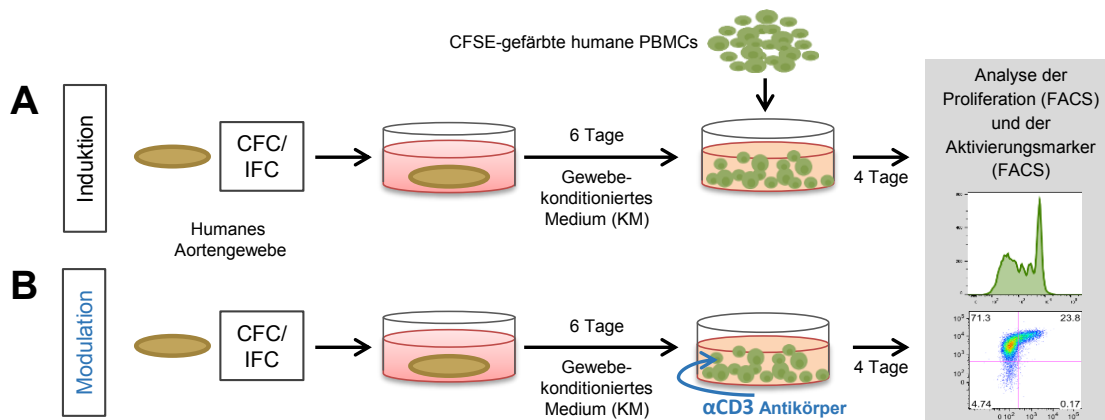


Abbildung 39: Experimentelles Design zur Untersuchung der T-Zellproliferation und -aktivierung durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC- Aortengewebe

Aortengewebestücke wurden zuvor nach definierten Protokollen für CFC oder IFC konserviert, nach dem erneuten Auftauen in Zellkulturmedium für 6 Tage inkubiert und konditioniertes Medium (KM) der Gewebekultur gewonnen. CFSE-gefärbte humane PBMCs wurden mit dem CFC-Gewebe- oder IFC-Gewebe-KM kultiviert. **A)** Zur Überprüfung der Induktion der T-Zell-Proliferation erfolgte keine zusätzliche Stimulation der PBMCs. **B)** Zur Überprüfung der Modulation der T-Zell-Proliferation erfolgte eine zusätzliche basale Aktivierung der PBMCs mit einem α CD3-Antikörper. Nach einer viertägigen Kulturdauer wurden die PBMCs geerntet, die Proliferationsrate anhand der Abschwächung des CFSE-Fluoreszenzsignals und die Expression charakteristischer Aktivierungsmarker mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt.

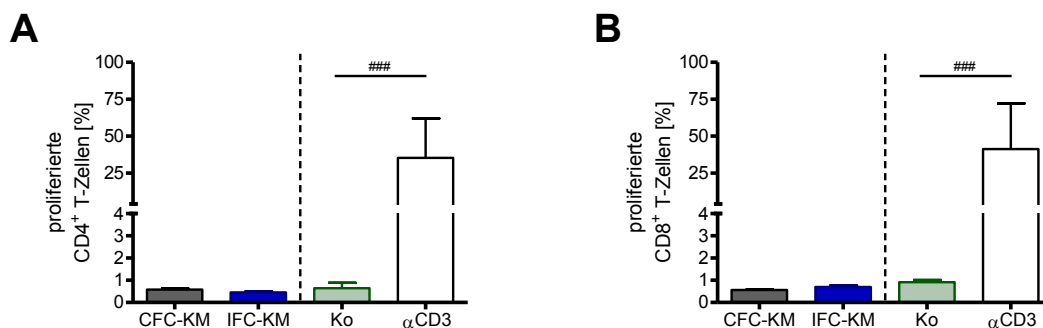


Abbildung 40: Induktion der Proliferation humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Gewebe

Humane CFSE-gefärbte PBMCs wurden mit konditioniertem Medium (KM) von CFC- und IFC-Gewebe inkubiert. Als Kontrollansatz wurden die PBMCs in Zellkulturmedium inkubiert (Ko) oder als Positivkontrolle mit α CD3 stimuliert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für T-Zell-Subpopulationen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der proliferierten CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen ist dargestellt. Die Werte (n=3) sind als Mittelwert + SEM gezeigt. Die Signifikanz für Ko vs. α CD3 wurde durch den Mann-Whitney-Test mit ### $p < 0,01$ ermittelt.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die löslichen Faktoren des kryokonservierten Aortengewebes ein kostimulatorisches Signal zur T-Zell-Proliferation liefern, da T-Zellen zwei Signale zur Aktivierung benötigen. Im folgenden Assay sollte daher die Kapazität des Aortengewebe-KMs zur Modulation der T-Zellproliferation untersucht werden.

Hierfür wurde für die T-Zellen das erste Signal, welches zur ihrer Aktivierung nötig ist, durch eine basale Stimulation mit α CD3 bereitgestellt. Erneut wurden CFSE-gefärbte PBMCs mit KM von CFC- und IFC-Aortengewebe kultiviert und zusätzlich wurden alle Ansätze mit einer niedrigen Dosis α CD3 (12,5 ng/mL) stimuliert. Die alleinige α CD3-Stimulation diente als Kontrolle (Ko), um die basale Proliferationsrate zu ermitteln. Das KM des CFC-Gewebes steigerte die Proliferationsrate der CD4⁺ T-Zellen in der Kontrolle von $42,7 \pm 10,2$ % auf $76,4 \pm 4,6$ %. IFC-KM erhöhte die Proliferationsrate kaum (Abb. 41A). Ebenso war für die CD8⁺ Population eine Steigerung der Proliferation durch CFC-KM von $52,5 \pm 12,1$ % auf $71,4 \pm 6,8$ % zu verzeichnen (Abb. 41B). Die Proliferationsrate der CD8⁺ T-Zellen erniedrigte sich sogar durch das KM von IFC-Gewebe auf $41,9 \pm 7,5$ %. Lösliche Faktoren des CFC-Gewebes, aber nicht des IFC-Gewebes liefern demnach ein zweites, kostimulatorisches Signal für die Proliferation humaner T-Zellen.

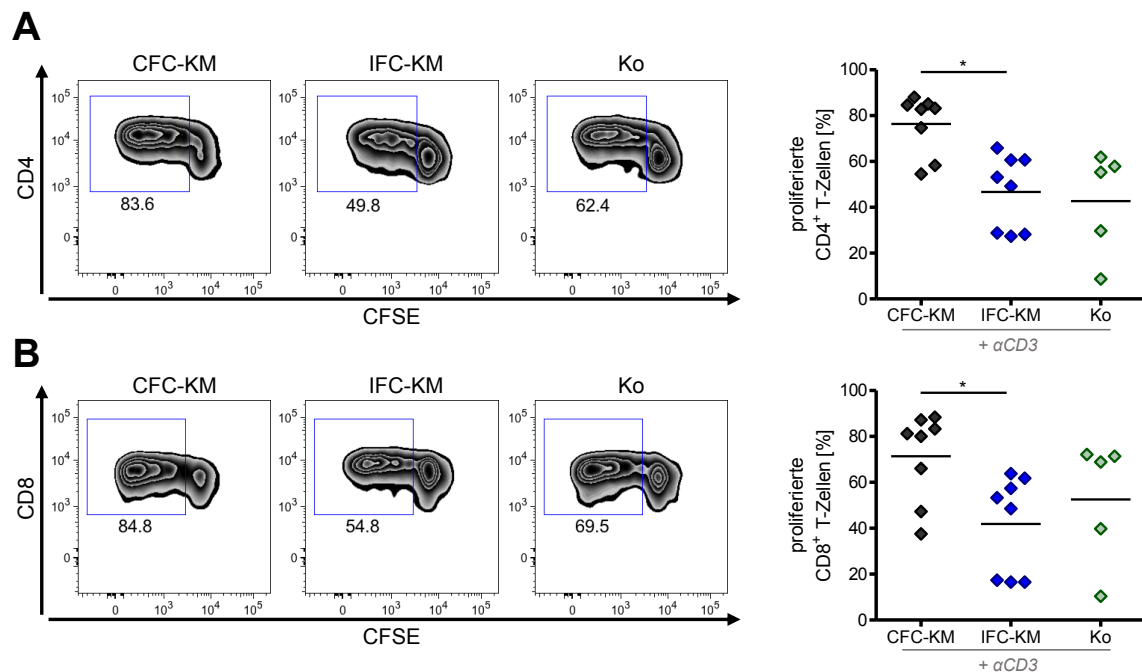


Abbildung 41: Modulation der Proliferation humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe

Humane CFSE-gefärbte PBMCs wurden mit konditioniertem Medium (KM) von CFC- und IFC-Aortengewebe bzw. als Kontrolle (Ko) mit Zellkulturmedium inkubiert. Bei allen drei Ansätzen erfolgte eine basale Stimulation mit α CD3. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für T-Zell-Subpopulationen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative FACS-Histogramme (links) zeigen die Proliferation (blaues Gate) von CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen in PBMC-Kulturen, welche mit CFC-KM, IFC-KM oder Zellkulturmedium (Ko) kultiviert wurden (alle jeweils + α CD3). In einem zusammenfassenden Diagramm (rechts) sind die Einzelwerte aller Experimente (n=5-8) mit Mittelwert dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) mit *p < 0,05 ermittelt.

4.3.6.2 Lösliche Faktoren des CFC-Gewebes induzieren eine erhöhte T-Zellaktivierung

In denselben Experimenten aus Abschnitt 4.3.6.1, wurde neben der Proliferationsrate auch der Aktivierungsstatus der T-Zellen in einer α CD3-stimulierten PBMC-Kultur unter dem Einfluss löslicher Faktoren aus CFC- und IFC-Aortengewebe nach 4 Tagen untersucht. Dazu wurden die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Analog zur Proliferationsrate konnte sowohl bei CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen eine signifikante Erhöhung der CD25-Expression unter dem Einfluss des KMs von CFC-Gewebe im Vergleich zum IFC-KM beobachtet werden (Abb. 42A). Dabei war die CD25-Expression unter dem Einfluss des CFC-KM auf CD4⁺ T-Zellen stärker als auf CD8⁺ T-Zellen.

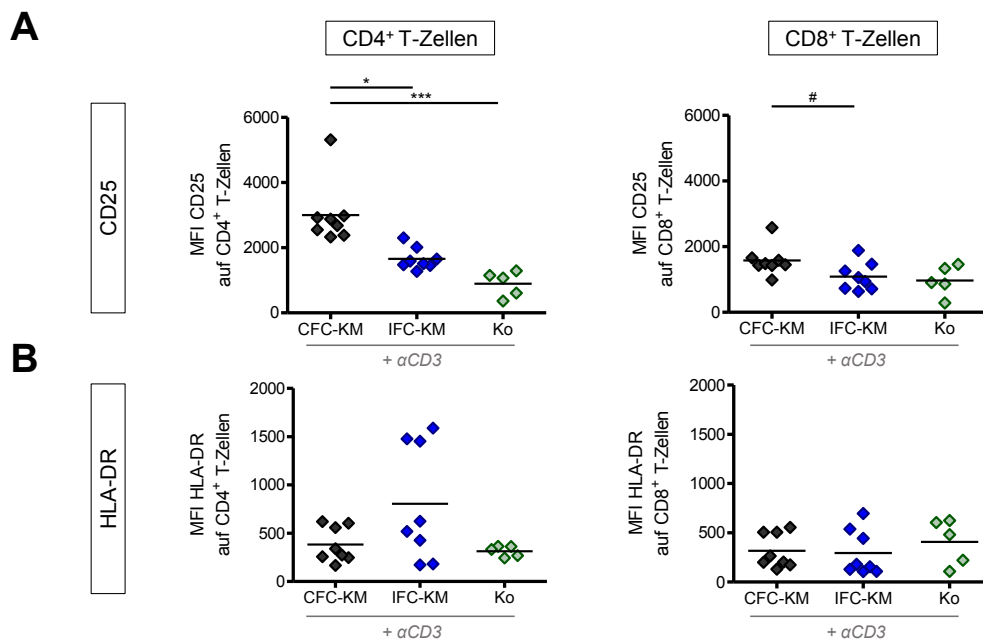


Abbildung 42: Aktivierung humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe

Humane CFSE-gefärbte PBMCs wurden mit konditioniertem Medium (KM) von CFC- und IFC-Aortengewebe, bzw. als Kontrolle (Ko) mit Zellkulturmedium inkubiert. Bei allen drei Ansätzen erfolgte eine basale Stimulation mit α CD3. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für T-Zell-Subpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ sowie für die Aktivierungsmarker CD25 (**A**) und HLA-DR (**B**) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expressionen der Aktivierungsmarker auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in PBMC-Kulturen, welche mit CFC-KM, IFC-KM oder Zellkulturmedium (Ko) kultiviert wurden (alle jeweils + α CD3) sind als mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) in den Diagrammen als Einzelwerte aller Experimente (n=5-8) mit Mittelwert dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Post Test mit *p < 0,05, ***p < 0,001 bzw. für CFC vs. IFC durch den Mann-Whitney-Test mit # p < 0,05 ermittelt.

HLA-DR ist ein Marker, welcher erst im späteren Verlauf der Aktivierung von T-Zellen verstärkt exprimiert wird. Eine Expression von HLA-DR war auf beiden T-Zell-Subpopulationen nach 4 Tagen zu verzeichnen, jedoch traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen mit CFC-KM, IFC-KM und der Kontrolle auf (Abb. 42B). Lediglich im Trend zeigte sich eine leichte Erhöhung von HLA-DR auf CD4⁺ T-Zellen unter dem Einfluss der CFC-Gewebefaktoren im Vergleich zur IFC-Kultur und Kontrolle.

4.3.6.3 Regulatorische T-Zellen werden unabhängig von der Kryokonservierungsmethode induziert

Wie in Abschnitt 4.3.6.2 beschrieben, wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T-Zellen signifikant bzw. im Trend durch jeweils CFC- oder IFC-KM erhöht (siehe Abb. 42). CD25 ist außerdem ein Marker, welcher bei hoher Expression (CD25^{high}) als Diskriminierungsmarker für die CD4⁺ Subpopulation der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) verwendet werden kann. Aus diesem Grund war das Ziel dieses Versuchs herauszufinden, inwieweit KM von CFC- und IFC-Aortengewebe T_{reg} induziert und ob hierbei Unterschiede zwischen den beiden Konservierungsmethoden bestehen. Dafür wurden PBMCs mit KM von CFC- und IFC-Aortengewebe kultiviert und zusätzlich mit α CD3 sowie dem kostimulatorischen Signal α CD28 aktiviert. Der alleinige α CD3/CD28-Stimulus diente als Kontrolle (Ko). Nach 5 Tagen erfolgte die Zellernte und die Expression des Markers CD25 sowie des T_{reg}-Markers *Forkhead Box Protein 3* (FoxP3) wurde auf der CD4⁺ Fraktion der T-Zellen analysiert. CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ T-Zellen wurden als T_{reg} definiert und deren Anteil in den PBMC-Kulturen bestimmt (Abb. 43A).

Es zeigte sich, dass bei T-Zellen, welche mit Aortengewebe-KM kultiviert wurden, ein signifikant größerer Anteil an T_{reg} nachgewiesen werden konnte, als in der Kontrolle (Abb. 43B). Jedoch ergab sich kein Unterschied im Anteil der T_{reg} zwischen den CFC-KM- und IFC-KM-Kulturen. Die Kryokonservierungsmethode des Aortengewebes hatte demnach keinen Einfluss auf die Induktion regulatorischer T-Zellen.

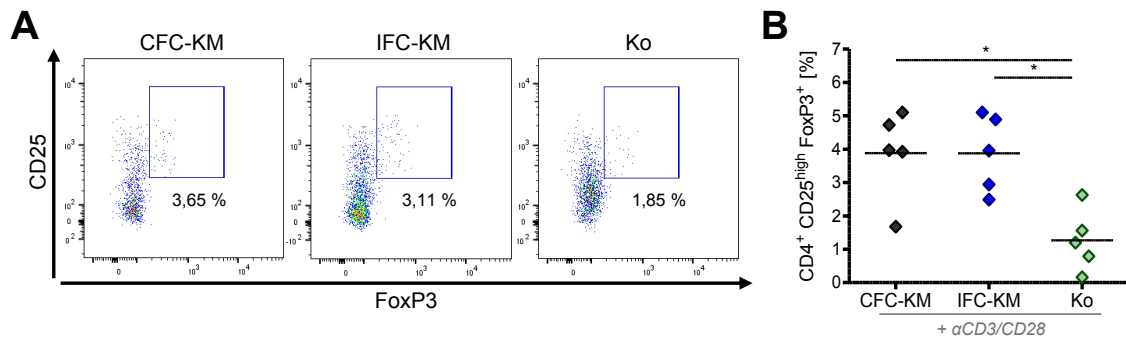


Abbildung 43: Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe

Humane PBMCs wurden mit konditioniertem Medium (KM) von CFC- und IFC-Aortengewebe, bzw. als Kontrolle (Ko) mit Zellkulturmedium inkubiert. Bei allen drei Ansätzen erfolgte eine basale Aktivierung mit α CD3/CD28. Nach 5 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit human-spezifischen Antikörpern für den T-Zell-Marker CD4 sowie den Aktivierungsmarker CD25 und den T_{reg}-Marker FoxP3 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A**) Repräsentative FACS-Plots von CD4⁺ T-Zellen zeigen den Anteil an CD25^{high} FoxP3⁺ Zellen (blaues Gate) in PBMC-Kulturen, welche mit CFC-KM, IFC-KM oder Zellkulturmedium (Ko) kultiviert wurden (alle jeweils + α CD3/28). **B**) In einem zusammenfassenden Diagramm sind die Einzelwerte aller Experimente (n=5) mit Mittelwert dargestellt. Die Signifikanz wurde durch eine einseitige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) mit *p< 0,05 ermittelt.

5 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise Atherosklerose, rheumatisches Fieber oder Endokarditis können zu einer Zerstörung der Herzklappen oder Gefäße führen. Für diese geschädigten Strukturen aber auch für Bypässe oder Dialyse-*Shunts* ist ein Gewebeersatz erforderlich [20, 24, 31, 32, 35]. Um eine bedarfsgerechte und zeitnahe Verfügbarkeit sicherzustellen, werden zur Transplantation gewonnene Gewebe konserviert und in Biobanken gelagert. Die Bereitstellung eines optimalen Ersatzes für geschädigte kardiovaskuläre Gewebe, welcher alle Anforderungen hinsichtlich Hämodynamik und -kompatibilität, Immunogenität, Langzeitfunktionalität sowie der Lagerung und des Transports erfüllt, ist nach wie vor ein ungelöstes Problem. Um all diese Bedürfnisse abzudecken, sind verbesserte Strategien und Technologien für die Konservierung von Geweben nötig. Erst kürzlich adressierte ein internationales Konsortium diese Problematik und forderte, die Forschung im Bereich der Konservierungsmethoden auszubauen und zu beschleunigen [159].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Konservierungsmethode einen Einfluss auf die Immunogenität humaner kardiovaskulärer Gewebe hat. Der Fokus lag hierbei auf dem Vergleich der konventionellen Kryokonservierung (CFC) mit der eisfreien Kryokonservierung (IFC). Während CFC derzeit den klinischen Standard für die Konservierung kardiovaskulärer Allografts darstellt, ist IFC eine neu entwickelte Methode. Zusätzlich wurde Glutaraldehyd (GA) -fixiertes Gewebe untersucht, um die Ergebnisse in den Gesamtkontext der Gewebekonservierung einordnen zu können.

Für die Untersuchungen wurde humanes Aortengewebe als Modell für kardiovaskuläres Gewebe genutzt. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des Gewebes nach CFC, IFC oder GA-Fixierung hinsichtlich seiner Struktur und seines Metabolismus. Nachfolgend wurde die humane allogene Immunreaktion auf das konservierte Gewebe *in vitro* untersucht. Dazu wurden die Interaktionen humaner Immunzellen mit dem Gewebe bzw. mit den vom Gewebe freigesetzten Faktoren in speziell dafür etablierten funktionellen *In-vitro*-Testsystemen analysiert, um die Mechanismen der zugrunde liegenden Immunantworten aufzuklären.

5.1 Für die Beschaffenheit des Endothels und die HLA-DR-Expression des Aortengewebes ist die Art der Kryokonservierung nicht entscheidend

Humanes Aortengewebe diente bei allen Untersuchungen als „*Proof-of-Principle*“-Gewebe für Herzklappen und Blutgefäße, da der strukturelle Aufbau dieser Gewebe vergleichbar ist. Sowohl Herzklappen als auch Blutgefäße sind an den Kontaktzonen zum Blutstrom mit einer Endothelzellschicht bedeckt. In den Gewebeschichten unterhalb des Endothels befinden sich als dominierende Zelltypen in den Herzklappen die valvulären interstitiellen Zellen (VICs) bzw. in den Blutgefäßen glatte Muskelzellen. Beide dieser fibroblastenartigen Zelltypen liegen unter physiologischen Bedingungen im Ruhezustand vor und halten die Homöostase des Gewebes aufrecht.

Im Zuge der Gewebecharakterisierung konnte die Endothelzellschicht auf dem Aortengewebe sowohl nach CFC als auch nach IFC durch den Marker CD31 nachgewiesen werden. Bei den mittels Immunfluoreszenz analysierten Gewebeschnitten war die Endothelzellschicht jedoch teilweise nicht mehr durchgängig vorhanden. Huber *et al.* wiesen ebenfalls bei porcinen Herzklappen nach CFC oder IFC nur eine diskontinuierliche Endothelzellschicht nach [160]. Lupinetti *et al.* beschrieben den Vorgang der Kryokonservierung als Ursache für den partiellen Verlust des Endothels bei humanen Allografts [161]. Denkbar ist aber auch, dass die beobachteten Schädigungen des Endothels entweder während der Präparation der Gewebeschnitte erfolgten oder sich bereits durch pathophysiologische Prozesse im Gewebespender ereignet hatten. Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl nach CFC als auch nach IFC das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR im Gewebe nachgewiesen werden. Die Kenntnis der Anwesenheit von Endothelzellen und HLA-DR auf dem Gewebe nach beiden untersuchten Kryokonservierungsmethoden ist im Hinblick auf Transplantationen von CFC- oder IFC-Geweben bedeutsam. Auf der einen Seite ist ein intaktes Endothel essentiell, um thrombotische Ereignisse zu verhindern [11, 84]. Auf der anderen Seite sind Endothelzellen aber auch für die Immunogenität im allogenen Setting verantwortlich, da sie neben MHC-Klasse-II-Molekülen zur Antigenpräsentation auch kostimulatorische Moleküle, wie beispielsweise das Lymphozyten-Funktions-assoziierte-Antigen 3 (engl.: *Lymphocyte Function-associated Antigen 3*, LFA-3), OX40-L oder ICOS-L exprimieren [162, 163]. *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen aufgrund dieser Oberflächenmoleküle, CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen stimulieren können. Aufgrund fehlender CD80-Expression sind sie jedoch nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren [141, 162, 163]. Die Infiltration und Aktivierung von T-Zellen wird oft als Hauptgrund

für die Rejektion und Zerstörung von Herzklappen-Allografts angesehen [162, 164]. Bezugnehmend auf Literaturangaben ist anzunehmen, dass das im Rahmen der Arbeit detektierte HLA-DR in der *Tunica media* des Aortengewebes von den glatten Muskelzellen exprimiert wurde [17]. Es ist jedoch bekannt, dass sowohl glatte Muskelzellen als auch VICs nicht in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren, sondern deren Anergie induzieren [142, 165]. Im Gegensatz zu Endothelzellen, sind daher die glatten Muskelzellen der *Tunica media* nicht primär für die Immunogenität von Allografts verantwortlich.

Aus der histologischen Charakterisierung kann abgeleitet werden, dass die Kryokonservierungsmethode keinen Einfluss auf die Antigen-präsentierende und kostimulatorische Funktion der Endothelzellen hat. Auch bei der Überprüfung der initialen Ereignisse der Komplementaktivierung konnten keine Veränderungen durch die Art der Kryokonservierung festgestellt werden. Unabhängig von der Methode, fand stets eine Aktivierung des Komplementsystems durch das Aortengewebe statt. Daher könnte im Hinblick auf eine allogene Immunreaktion *in vivo* angenommen werden, dass eine vergleichbare Antwort des Immunsystems durch CFC- und IFC-Allografts initiiert würde. Interessanterweise wurde aber für implantierte allogene IFC-Herzklappen im Schaf eine geringere Immunogenität im Vergleich zu CFC-Herzklappen beobachtet, welche durch eine verminderte Infiltration von T-Zellen gekennzeichnet war [51,53]. Demnach scheinen vor allem andere Faktoren als die Anwesenheit von Endothelzellen und HLA-DR für die unterschiedliche Immunogenität der kardiovaskulären Gewebe nach CFC oder IFC verantwortlich zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb weitere immunologische Mechanismen, insbesondere der angeborenen Immunantwort untersucht.

5.2 Herkömmliche Konservierungsmethoden wie CFC und GA-Fixierung fördern die Immunogenität kardiovaskulärer Transplantate

Die Konservierung kardiovaskulärer Allografts wird gegenwärtig mittels der CFC-Methode durchgeführt. Für Xenografts wird vorrangig eine GA-Fixierung angewandt, vor allem um neben der Konservierung auch eine Sterilisation zu erzielen und die Xeno-Immunogenität zu reduzieren [24]. Beide Methoden werden bei Herzklappenprothesen für die klinische Applikation genutzt, jedoch weisen sowohl CFC-Allografts als auch GA-fixierte Xenografts langfristig Veränderungen und Schädigungen des Gewebes aufgrund von Immunreaktio-

nen auf, was zum Funktionsverlust und letztendlich zur Notwendigkeit einer Reoperation führt [43, 57, 58].

Die Reaktion des humanen Immunsystems auf konservierte kardiovaskuläre Gewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* untersucht. Für die immunologischen Testungen *in vitro* sollte jedoch vorher eine Endotoxinbelastung ausgeschlossen werden bzw. der Grad der Belastung als „hinreichend gering“ definiert werden. Endotoxin bewirkt als PAMP *in vitro* und *in vivo* eine starke Aktivierung von Immunzellen und somit wäre eine Diskriminierung zwischen den Effekten des Endotoxins und denen des Gewebes *per se* nicht mehr möglich. In zwei verschiedenen Testsystemen wurde für das Aortengewebe nach CFC eine minimale Endotoxinkonzentration im Bereich von 1-2 EU/mL festgestellt (Abschnitt 4.3.1). Laut Richtlinie der *Food and Drug Administration* (FDA) der USA dürfen beispielsweise Medizinprodukte, welche in Kontakt mit dem kardiovaskulären System kommen, den Grenzwert von 0,5 EU/mL Spülvolumen oder 20 EU/Medizinprodukt nicht überschreiten [166]. Als Spülvolumen werden hierbei ca. 40 mL endotoxinfreies Wasser vorgeschlagen. Da die Aortengewebestücke jedoch nur in 1 mL Flüssigkeit gespült wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Endotoxinkonzentration der Gewebe in einem größeren Spülvolumen wesentlich geringer und somit unterhalb des Grenzwertes wäre. Im Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) wurde die Aktivierung der Immunzellen anhand deren TNF- α -Freisetzung nach Stimulation bestimmt. Dadurch ist eine bessere Einschätzung der biologischen Effekte durch Endotoxinkontaminationen möglich. Im MAT lag die durch CFC-Gewebe stimulierte TNF- α -Freisetzung deutlich unter dem Niveau der Positivkontrolle. Somit wurde die Endotoxinbelastung der zu untersuchenden CFC-Gewebe als „hinreichend gering“ definiert und folglich als Auslöser für die beobachteten Immunreaktionen in den funktionellen Tests *in vitro* ausgeschlossen.

Im Zuge der Gewebecharakterisierung konnte festgestellt werden, dass CFC die typische Struktur des Aortengewebes erhält. Sowohl die Anordnung der elastischen Fasern als auch die Zellkerne waren in den histologischen Färbungen des CFC-Gewebes nachweisbar (Abschnitt 4.2.1). Nach GA-Fixierung wurde hingegen eine veränderte Struktur der EZM detektiert. Auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine Veränderung der Oberfläche des Aortengewebes durch GA-Fixierung erkennbar, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zu dem veränderten morphologischen Erscheinungsbild der kokultivierten Makrophagen geführt hat (Abschnitt 4.3.5.2). Veränderungen der EZM durch *Cross-Linking* mittels GA sind ebenfalls in der Literatur beschrieben und werden als Ursache für Kalzifikation und Transplantatzerstörung gewertet [56, 58, 59, 167]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit mittels Licht-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie keine Schäden in der

Gewebestruktur durch CFC festgestellt wurden, konnte durch hochauflösendere Methoden bereits gezeigt werden, dass CFC die Fasern der EZM zerstört. So wiesen Multiphotonen- und Frequenzverdopplungs (engl.: *Second Harmonic Generation*, SHG) -Mikroskopie sowie Raman-Spektroskopie deutliche Veränderungen der Kollagen- und Elastinfasern in CFC-Geweben nach, obwohl mit konventionellen histologischen und biochemischen Methoden zunächst kein Unterschied zu nativem Gewebe detektiert wurde [44,45,51,53]. Verschiedene Berichte weisen auf eine direkte Korrelation von EZM-Veränderungen und Kalzifikation von Herzklappentransplantaten hin [168, 169]. Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass die sogenannte SynerGraft®-Technologie (CryoLife, Inc.) die strukturelle Integrität von Kollagen und Elastin in Herzklappen-Allografts mittels einer Kombination aus Kryokonservierung und Dezellularisierung erhält [170].

Durch CFC kam es weiterhin zum Zelltod im Gewebe (Abschnitt 4.2.2). Sowohl apoptotische als auch nekrotische Ereignisse wurden vornehmlich bei CFC-Aortengewebe detektiert. Eine quantitative Beurteilung, ob in CFC-Gewebe Apoptose oder Nekrose einen größeren Anteil aufweist, kann aus unseren Untersuchungen nicht erfolgen. Rendal-Vázquez *et al.* zeigten jedoch, dass der Zelltod in kryokonservierten Herzklappen zum Großteil durch Nekrose vermittelt wird [171]. Im Zuge nekrotischer Prozesse werden intrazelluläre Moleküle freigesetzt. Mitochondriale Proteine, welche dem in Bakterien vorkommenden Tripeptid fMLP ähneln, sind beispielsweise intrazelluläre DAMPS und potente Chemoattraktanten sowie Aktivatoren für PMNs [172]. Weiterhin wird angenommen, dass durch die Bildung von Eiskristallen während des CFC-Prozesses die Strukturen der EZM zerstört werden [47]. Bei einer EZM-Degradation können Peptidfragmente wie das N-Acetyl-Prolyl-Glycyl-Prolin (PGP) entstehen, welches die Chemotaxis von PMNs befördert [99]. Darüber hinaus ist auch Kollagen in der Lage, PMNs und Monozyten anzulocken [173, 174]. Die Vermutung liegt daher nahe, dass intra- wie auch extrazelluläre DAMPs, die während des CFC-Prozesses aus dem Gewebe freigesetzt werden, die Anlockung und Aktivierung von Immunzellen zur Folge haben. Diese Hypothese unterstützend, wurde in dem von uns durchgeführten Chemotaxis-Assay eine durch lösliche Faktoren des CFC-Gewebes induzierte erhöhte Migration von PMNs und Monozyten festgestellt. Auch die freigesetzten Faktoren des GA-fixierten Gewebes, jedoch nicht des IFC-Gewebes, lockten verstärkt PMNs und Monozyten an.

Die Rekrutierung von PMNs und nachfolgend von Monozyten wird neben DAMPs vornehmlich durch Chemokine und Zytokine befördert. PMNs reagieren vor allem auf IL-8 (CXCL8) und Monozyten auf MCP-1 (CCL2) oder IL-6, wie es die Daten des Chemotaxis-Assays übereinstimmend mit Literaturangaben belegen [105]. IL-6 hat neben chemotaktischen Eigenschaften auch einen maßgeblichen Einfluss auf Kalzifikationsprozesse [175].

CFC-Gewebe setzt verschiedene Zytokine und Chemokine frei, wobei vor allem eine starke Sekretion von IL-8, MCP-1 und IL-6 auffällig war (Abschnitt 4.2.3). Bei weiterführenden kinetischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass auch über einen Zeitraum von 6 Tagen kontinuierlich MCP-1 und IL-6 von den CFC-Gewebestücken produziert wurden, da diese Faktoren über die Zeit im Kulturmedium akkumulierten. Auch TGF- β 1 wurde in großen Mengen von CFC-Gewebe produziert, jedoch lag dieses vornehmlich in seiner inaktiven (gebundenen) Form vor. Man kann daraus ableiten, dass die Zellen des CFC-Gewebes vital sind und aktiv Zytokine herstellen und freisetzen. Diese Erkenntnis wurde ebenfalls durch die im MTS-Assay nachgewiesene hohe metabolische Aktivität des Aortengewebes nach CFC bestätigt. IFC- und GA-fixierte Gewebe hingegen zeigten nur eine sehr geringe metabolische Aktivität, was sich auch in der verminderten oder fehlenden Zytokinfreisetzung widerspiegelte.

Obwohl die löslichen Faktoren aus dem CFC- und GA-fixierten Gewebe starke chemotaktische Attractanten für PMNs darstellen, konnte keine signifikant verstärkte Aktivierung der PMNs *in vitro* festgestellt werden (Abschnitt 4.3.4.2). GA-fixiertes Gewebe bewirkte lediglich in der Tendenz eine stärkere Aktivierung der PMNs, was aus der Regulation der Marker CD66b und CD62L abzuleiten war. In dem in dieser Arbeit etablierten PMN-Aktivierungsassay zeigte sich nach vierstündiger Stimulation mit den Aktivatoren TNF- α , LPS oder dem Tripeptid fMLP beispielsweise eine Hochregulierung der Expression der Oberflächenmarker CD66b und CD63 sowie eine Reduktion der CD62L- und CD43-Expression auf den PMNs. Es sei jedoch anzumerken, dass auch die Kontroll-PMNs ohne zusätzliche Stimuli basal aktiviert wurden, was vermutlich im Isolations- und/oder Kultivierungsprozess begründet liegt. Die im PMN-Aktivierungsassay *in vitro* untersuchten Oberflächenmarker wurden zum Teil auch von Coughlan *et al.* im humanisierten Mausmodell für die Analyse humaner PMNs genutzt [176] und sollen nachfolgend kurz beschrieben werden. Eine Aktivierung des Rezeptors CD66b führt zur Sekretion des intrazellulär gespeicherten IL-8 in PMNs und kennzeichnet somit einen frühen Status der PMN-Aktivierung [177]. Das Tetraspanin CD63 ist nach Granula-Exozytose an der Oberfläche von PMNs zu finden und damit ein Aktivierungsmarker, welche auf eine Degranulation der PMNs hinweist [178, 179]. CD62L (L-Selectin) und CD43 (E-Selectin Ligand) sind beide in den Mechanismus der Extravasation der PMNs involviert. Eine Reduktion des Expressionsniveaus deutet auf ein Abspalten (*S Shedding*) der Moleküle hin, was ein entscheidender Prozess für die Transmigration und Aktivierung ist [176, 178]. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zur PMN-Kultivierung auf Aortengewebe nach CFC zeigten zwar keine Veränderungen der charakteristischen Aktivierungsmarker im Vergleich zur Kontrolle (PMN-Kultivierung auf der Zellkulturplatte),

jedoch bleibt zu untersuchen, ob *in vivo* eine Aktivierung der PMNs wirklich ausbleiben würde.

Im Verlauf der Immunreaktion *in vivo* rekrutieren infiltrierte PMNs nachfolgend Monozyten aus dem Blutstrom. Experimentell wurde dieses Szenario *in vitro* durch die Stimulation von Monozyten mit löslichen Faktoren der PMN-Aortengewebe-Kokultur nachgestellt (Abschnitt 4.3.4.3). Es zeigten sich jedoch nur geringe Modulationen des Monozytenphänotyps nach Stimulation mit den löslichen Faktoren der PMN-Aortengewebe-Kokulturen. Interessanterweise hatten jedoch die löslichen Faktoren des CFC-Gewebes (ohne PMN-Kokultur) einen signifikanten Einfluss auf die Expression der Moleküle CD16 und CD163. Damit einhergehend konnte auch ein Anstieg der Fraktion des intermediären Monozytentyps (CD14⁺⁺ CD16⁺), durch lösliche CFC-Gewebe-Faktoren festgestellt werden (Analyse nicht gezeigt). Eine explizite Deutung dieses Ergebnisses bleibt offen, jedoch könnte der Prozess des IL-6-*trans*-Signallings dafür verantwortlich sein. Es ist bekannt, dass PMNs nach Aktivierung und beginnendem Zelltod den löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) von ihrer Oberfläche abspalten [113, 114]. An diesen kann das aus dem CFC-Gewebe freigesetzte IL-6 binden. Weiterhin ist beschrieben, dass Endothelzellen in der Lage sind, diesen IL-6-sIL6R-Komplex zu binden und stimuliert zu werden, was sich in der Sekretion von MCP-1 äußert [115, 116]. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus in der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur stattgefunden hat und somit stark erhöhte MCP-1-Konzentrationen im konditionierten Medium vorhanden waren. Die hohe MCP-1-Konzentration im konditionierten Medium der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur kann als positiver Feedback-Loop zur vermehrten Expression des MCP-1-Rezeptors CCR2 auf Monozyten beitragen [180]. CCR2 wiederum wird vor allem von den klassischen CD16⁻ Monozyten (CCR2^{high}) exprimiert und nur in sehr geringem Maß von den intermediären CD16⁺ Monozyten (CCR2^{low}) [118]. In Übereinstimmung damit konnten nach Stimulation mit dem konditionierten Medium der PMN-CFC-Gewebe-Kokultur vor allem CD16⁻ Monozyten detektiert werden (Abschnitt 4.3.4.3). Hingegen konnte im Kontrollansatz, in welchem keine PMNs auf dem CFC-Gewebe kultiviert wurden, vermutlich kein IL-6-*trans*-Signalling stattfinden. Die MCP-1-Freisetzung ins konditionierte Medium des CFC-Gewebes konnte somit nicht verstärkt werden. Es ist anzunehmen, dass dadurch die CD16-Expression auf Monozyten stimuliert wurde, was auf den intermediären Phänotyp (CD16⁺ CCR2^{low}) hinweist.

Anhand der aus dem Chemotaxis-Assay vorliegenden Daten zur verstärkten Immunzellmigration zum CFC-Gewebe *in vitro*, ist für das Szenario *in vivo* ebenfalls eine Infiltration von PMNs ins CFC-Transplantat anzunehmen. Dementsprechend würde das IL-6-*trans*-Signalling stattfinden können und große Mengen an MCP-1 sezerniert werden, was vornehmlich die Rekrutierung der klassischen CD14⁺⁺ CD16⁻ CCR2^{high} Monozyten zu CFC-Gewebe

hin befördern würde. Klassische Monozyten migrieren schnell ins geschädigte Gewebe und treiben die immunologische Reaktion weiter voran [122]. Die Expression von CCR2 auf den Monozyten und die MCP-1-Konzentration im konditionierten-Medium der PMN-Gewebe-Kokultur wurden im Rahmen der Arbeit zwar nicht bestimmt, wären jedoch interessante Punkte für weiterführende mechanistische Untersuchungen.

In das Gewebe migrierte Monozyten differenzieren zu Makrophagen und polarisieren abhängig von den Umgebungsfaktoren. Es ist bekannt, dass der Polarisationsstatus von Makrophagen entscheidend für die Langzeitfunktionalität implantierter Gewebe ist und *In-vitro*-Untersuchungen entscheidende Prognosen liefern können [124, 181–184]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Assay zur Analyse der Makrophagenpolarisation durch das Aortengewebe entwickelt. Die Makrophagen wurden dazu direkt auf dem Gewebe kultiviert. Die Art der Kultivierung ist dahingehend entscheidend, dass nicht nur lösliche Faktoren die Polarisation beeinflussen, sondern die Oberflächenbeschaffenheit und -struktur ebenso ausschlaggebend sind [183, 185–187]. In der Tat konnten lösliche Faktoren des Aortengewebes aller untersuchten Konservierungsmethoden kaum Veränderungen in der Expression der Polarisationsmarker auf den Makrophagen induzieren (Abschnitt 4.3.5.3). Als klare Marker einer M1-Polarisation gingen aus den Etablierungsversuchen zuvor die verstärkte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 sowie des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR hervor. Als Marker einer Polarisation zum M2a- bzw. M2c-Makrophagentyp konnte die erhöhte Expression des Mannose-Rezeptors CD206 bzw. des *Scavenger*-Rezeptors CD163 definiert werden. Jedoch sind diese beiden Oberflächenmoleküle eher schwache Marker im Gegensatz zur Charakterisierung des M1-Phänotyps. In der Literatur sind weitere Marker für polarisierte Makrophagen beschrieben, welche jedoch oft auf mRNA-Expressionsdaten beruhen oder nur für das murine System zutreffen [124, 158]. Die Analyse der Oberflächenmarker von Makrophagen zeigte eine leichte Erhöhung der CD206-Expression, nach Kultivierung der Zellen auf beiden kryokonservierten Geweben (Abschnitt 4.3.5.2). Dies deutet auf eine M2a-Polarisation, also einen anti-inflammatorischen Makrophagenphänotyp hin [126]. M2-Makrophagen sind beispielsweise für eine Geweberegeneration nach Myokardinfarkt erforderlich [188, 189]. Sie fördern das *Remodelling* des Gewebes unter anderem auch durch die Phagozytose apoptotischer Zellen und Zelltrümmer. Es kann demnach angenommen werden, dass die zellfreie Matrix bei CFC- und IFC-Geweben, wie sie nach Implantation *in vivo* stets nachgewiesen wurde [51–53, 190] auf die Phagozytose-Aktivität von M2-Makrophagen zurückzuführen ist. Andere Studien zur Rejektion von Allografts *in vivo* berichten jedoch, dass ins Transplantat infiltrierte M2-Makrophagen zur Fibrose sowie chronischen Abstoßung geführt haben [191, 192].

Die Ergebnisse der Makrophagen-Gewebe-Kokultur-Experimente zeigen, dass GA-fixiertes Gewebe, im Gegensatz zu kryokonserviertem Gewebe, eine Polarisation des M1-Phänotyps induziert. Li *et al.* konnten zeigen, dass M1-Makrophagen zur Kalzifikation von Herzklappen beitragen [193]. Diese Daten und die Resultate der vorliegenden Arbeit unterstreichen den in der Literatur beschriebenen Fakt, dass GA-Fixierung zu einer Veränderung der Gewebestruktur sowie Kalzifikation und damit einhergehender schlechten Langzeitfunktionalität von Herzklappen führt [58, 59, 194].

Wie eingangs erwähnt, sind vor allem T-Zellen an der Rejektion von Allografts beteiligt. Sowohl bei CFC- als auch bei GA-fixiertem Gewebe wurden *in vivo* Infiltrationen von T-Zellen nachgewiesen [51, 59]. Die Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche im Rahmen dieser Arbeit lassen sich in dieses Szenario einordnen. Lösliche Faktoren des CFC-Aortengewebes können zwar nicht *per se* eine Proliferation der T-Zellen auslösen, jedoch stellen sie potenziell das zweite Signal für eine T-Zellaktivierung dar. Dies konnte durch eine Verstärkung der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in α CD3-stimulierten PBMC-Kulturen gezeigt werden. Analog dazu wiesen vorherige Untersuchungen unserer Gruppe eine Steigerung der T-Zellproliferation durch xenogene CFC-Herzklappen nach [54].

Neben den aus dem CFC-Gewebe freigesetzten Zytokinen ist auch die Beteiligung von DAMPs an der Aktivierung von T-Zellen denkbar. Da T-Zellen ebenfalls TLRs exprimieren, kann eine Aktivierung dieser durch DAMPs als zweites, kostimulatorisches Signal dienen [89]. Eine Aktivierung von T-Zellen wurde vor allem durch die erhöhte Expression von CD25 (α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors) gezeigt (Abschnitt 4.3.6.2). Neben der Funktion als Aktivierungsmarker dient CD25 unter anderem als Marker regulatorischer T-Zellen (T_{reg}). Hinter dem Anstieg der CD25-Expression wäre demnach auch eine Erhöhung der Population von T_{reg} zu vermuten. In weiterführenden Experimenten konnte zwar eine verstärkte Induktion von T_{reg} durch die löslichen Faktoren des CFC-Gewebes gezeigt werden, jedoch wurde auch eine vergleichbare Menge von T_{reg} durch IFC-Gewebe-Faktoren generiert. T_{reg} werden durch TGF- β induziert und sind essentiell für die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunantworten [195, 196]. CFC-Gewebe sekretiert hohe Konzentrationen der inaktiven Form des TGF- β , jedoch setzt es ebenfalls große Mengen an IL-6 frei. Die Kombination aus TGF- β und IL-6 befördert wiederum die Polarisation zu Th17-Zellen, welche zu chronischen Entzündungen beitragen [197]. Dieses Zusammenspiel von TGF- β und IL-6 kann eine Erklärung für die in CFC-Gewebe beobachtete andauernde T-Zellinfiltration *in vivo* [51, 53] sowie für in dieser Arbeit gezeigte T-Zellaktivierung und -proliferation *in vitro* bieten. Eine Analyse des Induktionspotenzials von CFC-Gewebe für die Entstehung von Th17-Zellen wurde jedoch noch nicht durchgeführt und sollte ein Aspekt künftiger Untersuchungen auf diesem Gebiet sein.

5.3 IFC senkt die Immunogenität kardiovaskulärer Transplantate

Biermann *et al.* und Lisy *et al.* postulierten in ihren Langzeitstudien zu Implantationen von allogenen IFC-Herzklappen, dass diese eine verbesserte Langzeitfunktionalität im Patienten aufweisen werden [51, 53]. Die zugrunde liegenden Mechanismen der vermuteten reduzierten Immunogenität waren bisher nicht bekannt, können jedoch nun durch die erhobenen Daten dieser Arbeit zum Teil erklärt werden.

Wie zuvor in Abschnitt 5.1 erwähnt, bewahrt die IFC-Methode die Struktur der EZM des Aortengewebes. Dies konnte zum einen in unseren histologischen Analysen mit der regelmäßigen Anordnung der EZM-Fasern sowie der Anwesenheit der Zellkerne bestätigt werden. Zum anderen zeigten moderne Analyseverfahren, dass die Integrität der Kollagen- und Elastinfasern auch auf mikrostruktureller Ebene bewahrt wurde [198, 199]. Obwohl im Aortengewebe nach IFC noch Zellen vorhanden waren, konnte nur ein Minimum an metabolischer Aktivität festgestellt werden (Abschnitt 4.2.1). Ähnliche Resultate wurden zuvor auch für porcine IFC-Arterien gezeigt [50]. Die Vermutung, dass die Zellen im Gewebe durch Apoptose oder Nekrose zugrunde gegangen sind, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Ferner kann angenommen werden, dass sich durch die hohe Konzentration an Kryoprotektanzien der IFC-Lösung VS83 der osmotische Gradient im Gewebe unvermittelt ändert, wodurch den Zellen das Wasser entzogen wird, jedoch die Zellmembran intakt bleibt. Eine Rehydratation der Zellen ist nachfolgend selbst während des Waschprozesses nicht mehr möglich, wodurch der Metabolismus der Zellen weiterhin auf ein Minimum reduziert bleibt und zudem kaum Zellen in Apoptose oder Nekrose gehen.

In vivo konnten bei implantierten IFC-Herzklappen jedoch schon nach 1-2 Wochen keine Zellen mehr detektiert werden [52]. Biermann *et al.* nahmen dabei an, dass diese Dezellularisierung passiv durch den Blutfluss und die mechanische Belastung des Gewebes realisiert wird. Eine Beteiligung von Makrophagen an einer Elimination der Zellen, wie es bereits in Abschnitt 5.2 diskutiert wurde, kann hingegen auch vermutet werden. Die im Makrophagen-Polarisations-Assay beobachtete Erhöhung der CD206- sowie CD16-Expression bei Makrophagen, welche auf IFC-Aortengewebe kultiviert wurden, zeigt eine Polarisation in Richtung des phagozytierenden M2-Phänotyps an und lässt sich in das erwähnte Szenario einordnen. *In vivo* könnte demnach IFC-Gewebe als eine Art „dezellularisiertes“ Gewebe betrachtet werden. Dezellularisierung, durch die Anwendung von Detergenzien und Enzymen, wird ebenfalls als Strategie zur Konservierung von Geweben und Reduktion ihrer Immunogenität angewandt. Eine Vielzahl verschiedener Protokolle zur Dezellularisierung kardio-

vaskulärer Gewebe existieren [170, 200–202], jedoch sind die bisherigen klinischen Resultate unbefriedigend [73, 74, 203]. Es wird angenommen, dass die Ursache dafür in der durch die harschen Reagenzien zerstörten EZM-Struktur begründet liegt [79, 204]. Außerdem sind Dezellularisierungs-Protokolle oft sehr aufwändig und kostenintensiv. Die IFC-Methode würde dagegen eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode zur Gewebekonservierung unter Erhalt der EZM darstellen. Kürzlich beschrieben Muratov *et al.* eine der IFC ähnlichen Methode, welche sie als „Devitalisierung“ bezeichneten [205]. Die durch Digitonin und EDTA „devitalisierten“ Herzklappen-Allografts zeigten ebenfalls gute mechanische Eigenschaften sowie im Gegensatz zu CFC-Gewebe, keine Thrombusbildung oder Immunzellinfiltration *in vivo*. Diese Ergebnisse weisen Parallelen zu den Effekten durch IFC auf. Jedoch fand bei den „devitalisierten“ Geweben keine detaillierte Analyse der EZM statt und bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden keine weiterführenden Studien zu dieser Methode veröffentlicht.

In Übereinstimmung mit der verringerten metabolischen Aktivität des Aortengewebes nach IFC konnte auch eine verminderte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen festgestellt werden (Abschnitt 4.2.3). Jedoch war die Freisetzung der Zytokine nicht wie bei GA-fixiertem Gewebe komplett unterbunden, sondern lediglich stark reduziert gegenüber der Ausschüttung aus CFC-Gewebe. Dies wurde beispielsweise für die pro-inflammatorischen Zytokine MCP-1 und IL-6 gezeigt, hingegen wurde das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 weiterhin in vergleichbaren Konzentrationen wie vom CFC-Gewebe freigesetzt. Interessanterweise fiel bei der kinetischen Analyse der MCP-1- und IL-6-Freisetzung aus dem IFC-Gewebe auf, dass sich die Menge der Zytokine im konditionierten Medium nicht über die Zeit hinweg erhöhte, wie dies bei CFC-Gewebe der Fall war. Anhand dieser Feststellungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die aus dem IFC-Gewebe freigesetzten Zytokine nicht aktiv von den Zellen produziert, sondern in der EZM gespeichert und daraus freigesetzt werden.

Die eingeschränkte Zytokinsekretion sowie die unbeschädigte EZM und Abwesenheit nekrotischer Zellen (keine DAMPs) würde zu einer verminderten Anlockung von Immunzellen durch IFC-behandeltes Gewebe führen, was im Rahmen dieser Arbeit im durchgeführten Chemotaxis-Assay *in vitro* vor allem für PMNs und Monozyten bestätigt wurde. Diese Daten zur Immunzellmigration liefern somit auch eine Erklärung für die verringerte Infiltration von Immunzellen, wie sie bei IFC-Transplantaten *in vivo* beobachtet wurde [51, 53]. Ebenso verstärkte das konditionierte Medium des IFC-Gewebes nicht die Proliferation von α CD3-stimulierten T-Zellen, woraus sich wiederum schließen lässt, dass IFC-Gewebe keine kostimulatorischen Signale für die T-Zellaktivierung freisetzt. Darüber hinausgehend kann

die reduzierte IL-6-Freisetzung aus IFC-Gewebe zur Apoptose von T-Zellen führen, da IL-6 ein wichtiges Überlebenssignal für T-Zellen liefert [206, 207].

Während der Analyse der freigesetzten Zytokine war außerdem auffällig, dass das vom IFC-Gewebe sekretierte TGF- β 1 hauptsächlich in seiner aktiven Form vorlag. CFC-Gewebe setzte zwar mehr Gesamt-TGF- β 1 frei, jedoch lag dieses überwiegend in der inaktiven Form vor. TGF- β 1 wird von Zellen als Propeptid synthetisiert, welches nach der Modifikation im Golgi-Apparat als Homodimer über nichtkovalente Bindung an das LAP gebunden vorliegt. In dieser als *Small Latent Complex* (SLC) bezeichneten Form ist das TGF- β 1 inaktiv, da eine Bindung an seinen Rezeptor nicht möglich ist [153]. Der SLC ist wiederum kovalent über das *Latent TGF- β -Binding Protein* (LTBP) an Komponenten der EZM gebunden und kann somit dort gespeichert werden [208]. Eine Aktivierung, also eine Freisetzung des gebundenen TGF- β 1 aus dem Komplex, ist durch Änderungen des pH-Wertes (Denaturierung des LAP), oxidative Prozesse (z.B. durch ROS), proteolytische Spaltung (z.B. durch Metalloproteinasen), mechanische Kräfte oder die Bindung von Integrinen möglich [153, 209–212]. Wir nahmen deshalb an, dass die spezielle Zusammensetzung der IFC-Lösung VS83 möglicherweise durch Denaturierungs- oder oxidative Prozesse eine Aktivierung des gebundenen TGF- β 1 auslöst, was nicht durch die CFC-Lösung möglich ist. Tatsächlich konnten wir experimentell zeigen, dass allein DMSO in hoher Konzentration (36 %) oder Formamid, wie in der VS83-Lösung vorliegend, in der Lage sind, TGF- β 1 partiell zu aktivieren. TGF- β ist an zahlreichen anti-inflammatorischen und regulatorischen, aber auch an pro-inflammatorischen Prozessen der Immunantwort beteiligt. Die initiale Freisetzung von aktivem TGF- β 1 aus dem IFC-Gewebe könnte somit ein entscheidender Faktor in der Modulation der Immunantwort im Unterschied zu CFC-Gewebe sein. Ein eindeutiger Zusammenhang dafür konnte jedoch nicht in den funktionellen *In-vitro*-Untersuchungen in dieser Arbeit erbracht werden. In der Literatur wird beispielsweise beschrieben, dass TGF- β die Aktivierung von Monozyten zum intermediären bzw. nicht-klassischen CD16⁺ Phänotyp unterstützt [213]. Vor allem auch in Kombination mit IL-10 fördert TGF- β lokal die Differenzierung der klassischen Monozyten zum intermediären Subtyp [214]. Jedoch konnte bei der Analyse des Monozytenphänotyps nach Stimulation mit den löslichen Faktoren des IFC-Gewebes nur eine minimale Erhöhung der CD16-Expression detektiert werden (Abschnitt 4.3.4.3). In einer Studie mit unseren Kooperationspartnern Högerle *et al.* wurde im Gegensatz dazu festgestellt, dass die nachträgliche Behandlung von CFC-Geweben mit der IFC-Lösung VS83 zu einer signifikante Erhöhung der CD16-Expression auf Monozyten führt [215]. Die Abweichung zu den vorliegenden Daten könnte auf die lediglich nachträgliche Behandlung mit VS83 zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, dass die Monozyten schon zu Makrophagen differenziert waren, da bei der Studie

von Högerle *et al.* die erhöhte CD16-Expression der Monozyten nach 7 Tagen, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit nach 2 Tagen, analysiert wurde. Wie bereits diskutiert, wurde im Makrophagen-Polarisations-Assay eine erhöhte CD16-Expression sowie eine Herabregulation von CD14 und CD163 bei den Makrophagen (CD14^{low} CD16^{high}), welche auf IFC-Gewebe kultiviert wurden, nachgewiesen (Abschnitt 4.3.5.2). Zizzo *et al.* beschreiben für dieses Muster der Markerregulation die Polarisation in einen M2c-Phänotyp, welcher durch TGF- β induziert wurde [137]. Der funktionelle Zusammenhang zwischen der Freisetzung von aktivem TGF- β 1 aus IFC-Gewebe und der Induktion des CD14^{low} CD16^{high} M2c-Makrophagentyps konnte jedoch in den mechanistischen Untersuchungen durch die Blockierung von TGF- β 1 mit einem neutralisierenden Antikörper nicht bestätigt werden (Abschnitt 4.3.5.4). Weiterhin konnte durch lösliche Faktoren des IFC-Gewebes im Vergleich zu CFC-Gewebe auch keine verstärkte Induktion von T_{reg}, welche durch TGF- β 1 induziert werden, nachgewiesen werden.

Insofern konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar kein direkter Nachweis über die mechanistische Wirkung des freigesetzten aktiven TGF- β 1 aus IFC-Gewebe erbracht werden, jedoch stellt dies einen wichtigen Ansatz für nachfolgende Untersuchungen dar. Ein wichtiger Punkt wäre es, die TGF- β -Effekte im Hinblick auf eine mögliche Induktion fibrotischer Prozesse zu beleuchten. Denn TGF- β führt in Fibroblasten zur Aktivierung von Genen der EZM-Produktion sowie zur Suppression von Metalloproteinasen [216, 217]. Eine kontinuierliche TGF- β -Stimulation der Fibroblasten führt zu einer Überproduktion und Ablagerung von EZM, insbesondere Kollagen. Darüber hinaus werden gegenregulierende Mechanismen, wie die Matrixdegradation durch Metalloproteinasen der Fibroblasten, unterdrückt. Zusätzlich treiben M2-Makrophagen die Fibrosierung durch die Produktion von TGF- β und EZM-Proteinen weiter voran [133, 134].

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass das IFC-Gewebe und insbesondere die Kombination bzw. die Abwesenheit freigesetzter Faktoren *in vitro* zu einer abgeschwächten Immunreaktion führt. Folglich kann angenommen werden, dass auch *in vivo* bei IFC-Transplantaten eine reduzierte Anlockung und Migration von PMNs, Monozyten und nachfolgend eine geringe T-Zellinfiltration, -aktivierung und -proliferation durch die verminderte Sekretion von Zytokinen und DAMPs stattfinden wird (siehe Abb. 44).

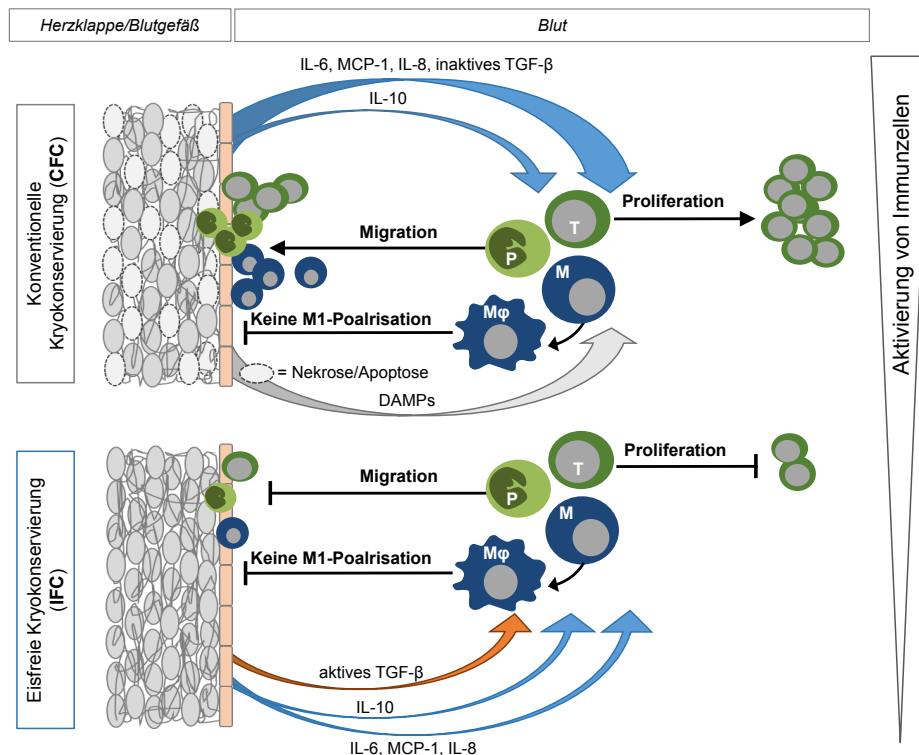


Abbildung 44: Vorgeschlagener Mechanismus zur Erklärung der reduzierten Immunogenität von Gewebetransplantaten durch IFC gegenüber CFC

Durch CFC werden Gewebestrukturen und Zellen teilweise zerstört, wodurch DAMPs freigesetzt werden. Außerdem sekretiert CFC-Gewebe große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, MCP-1, IL-8 sowie inaktives TGF- β . Dies führt zur starken Aktivierung von Immunzellen im Blut. PMNs (P) und Monozyten (M) infiltrieren in das Gewebe, wo letztere zu Makrophagen (M ϕ) differenzieren, die Immunreaktion fortsetzen und nachfolgend T-Zellen (T) aktiviert werden. Im Gewebe finden nach IFC kaum apoptotische oder nekrotische Ereignisse statt. Die Zellen weisen jedoch eine verminderte metabolische Aktivität, verbunden mit einer reduzierten Zytokinsekretion auf, TGF- β wird hingegen in seiner biologisch aktiven Form sekretiert. Diese Faktoren schwächen die Aktivierung von Immunzellen ab. Insbesondere die Migration und Infiltration von PMNs, Monozyten und T-Zellen wird reduziert (Abbildung modifiziert nach Schneider *et al.* 2017 [218]).

5.4 Ausblick

Die hier beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss der Kryokonservierung kardiovaskulärer Gewebe auf die humane Immunantwort basieren auf Testsystemen *in vitro* und unterliegen zweifellos gewissen Limitationen. Die Verwendung primärer humaner Immunzellen anstelle von Zelllinien verschaffte eine gute Annäherung an die Situation *in vivo*, trotzdem waren durch die biologische Variabilität der Immunzellspender Varianzen in den Reaktionen der Zellen zu verzeichnen. Obwohl durch die Kultivierung der Immunzellen direkt auf dem Gewebe der Einfluss der unnatürlich-steifen Zellkulturplatte umgangen wurde, wird am Beispiel der Polarisation der Makrophagen deutlich, dass eine eindeutige Vorhersage aus den *In-vitro*-Daten auf die Langzeitfunktionalität von kryokonservierten Geweben im

Patienten nicht gänzlich möglich ist. Die Analyse der Immunzellen zeigt stets nur ihren Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt. Beim Ablauf einer Immunreaktion ist aber vor allem die Balance der stattfindenden pro- und anti-inflammatorischen Prozesse wichtig. So ist im Fall einer Wundheilung und Geweberegeneration zunächst durchaus die Beteiligung von M1-Makrophagen essentiell, jedoch ist eine nachfolgende rasche Umstellung auf die Anwesenheit von M2-Makrophagen zur Beendigung der Immunreaktion unerlässlich [83]. In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend isolierte Immunzellpopulationen betrachtet. Dies ist für die Untersuchung zellspezifischer Effekte nützlich, hingegen herrscht *in vivo* stets ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen und löslicher Faktoren vor. Es wurden im Rahmen der Arbeit sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten des Immunsystems im Detail untersucht, jedoch war eine vollständige Analyse aller Immunzellpopulationen nicht realisierbar. Dendritische Zellen (DCs) beispielsweise, stellen als Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Funktion in der Kommunikation des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem dar. Sie induzieren eine Antigen-spezifische T-Zellantwort, welche die Differenzierung zu unterschiedlichen Effektor-T-Zellen oder T_{reg} nach sich zieht [219, 220]. Diverse Studien illustrieren, dass Biomaterialien, deren Oberflächenstruktur oder lösliche Faktoren sowie EZM-Proteine die Reifung und Differenzierung von DCs beeinflussen [221, 222]. Eine genauere Betrachtung dieses Zelltyps wäre daher sinnvoll, um die Langzeitfunktionalität kryokonservierter Gewebe besser abschätzen zu können.

Erste *In-vivo*-Studien im Schaf zum Einsatz von CFC- und IFC-Gewebe konnten bereits eine Vorstellung zu den ablaufenden Reaktionen über einen längeren Zeitraum im komplexen System des Modellorganismus liefern [51–53]. Schafe sind gute Modellorganismen für die Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen, jedoch ist eine Untersuchung der stattfindenden immunologischen Prozesse aufgrund begrenzter diagnostischer Werkzeuge (z.B. monoklonale Antikörper) limitiert [223]. Für präklinische Untersuchungen des humanen Immunsystems wäre die Verwendung eines humanisierten Mausmodells ein vielversprechender Ansatz. NOD-*Scid*-IL2Rgamma^{null}-Mäuse (NSG-Mäuse) sind immundefiziente Tiere, ohne reife Lymphozyten und NK-Zellen, in denen eine Rekonstitution mit humanen Immunzellen erfolgen kann [224]. Eine subkutane oder sogar kardiovaskuläre Applikation von CFC- und IFC-behandelten humanen Geweben bei NSG-Mäusen würde einen weiteren Aufschluss über die humane Immunantwort auf die allogenen Transplantate geben. In einem ersten *Proof-of-Principle*-Versuch, den wir bereits in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt haben, wurden NSG-Mäusen humane CFC-Aortengewebestücke subkutan appliziert. Die Mäuse konnten erfolgreich mit humanen Immunzellen (CD45⁺ Zellen) rekonstituiert werden (sowohl in der Peripherie als auch in der Milz) und auch nach 3 Wochen waren keine

Anzeichen einer *Graft-versus-Host*-Reaktion erkennbar (Daten nicht gezeigt). Es steht demzufolge nun ein Modell zur Verfügung, um vergleichende Studien zur Analyse der Reaktion des humanen Immunsystems auf die unterschiedlich kryokonservierten Gewebetransplantate durchzuführen. Die Durchführung solcher Versuche sollte auf dem Weg der Translation der IFC-Methode in die klinische Praxis einbezogen werden.

Zusätzlich weist die IFC-Methode auch hinsichtlich finanzieller sowie logistischer Aspekte Vorteile gegenüber der CFC-Methode auf [39]. Ungeachtet der vielversprechenden Resultate für IFC-behandelte Allografts bleibt jedoch das Problem der limitierten Verfügbarkeit allogener kardiovaskulärer Gewebe bestehen. IFC wurde auch bei xenogenen Herzklappen und Gefäßen mit vergleichbaren Ergebnissen angewendet [50, 54, 160]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte jedoch, dass das xenogene Antigen α -Gal, welches von erheblicher klinischer Bedeutung ist, weiterhin auf dem IFC-Gewebe vorhanden ist [54]. Das α -Gal-Antigen wird von den meisten Säugetiere, jedoch nicht vom Menschen exprimiert. Der Mensch besitzt hingegen natürliche Antikörper gegen das α -Gal-Epitop, welche ca. 1 % der zirkulierenden Immunglobuline ausmachen [225]. Die Bindung der α -Gal-Antikörper an ihr Epitop führt zur Aktivierung des Immunsystems und schlussendlichen Rejektion transplantierte, xenogener Gewebe. Es wurden bereits α -Gal-Knockout-Schweine gezüchtet, um diese Barriere überwinden zu können [226]. Die Nutzung dieser Schweine als Gewebequelle wäre demnach eine zukünftige Strategie, wenn die IFC-Methode auch bei Xenografts in der Klinik Anwendung finden soll.

Weiterhin ist vor einer Translation der IFC-Methode in die Klinik zu klären, ob die in der VS83-Lösung verwendeten Reagenzien nach den Waschschritten noch im Gewebe verbleiben. DMSO, Formamid und 1,2-Propandiol sind die wesentlichen kryoprotektiven Substanzen der VS83-Lösung. 1,2-Propandiol (auch Propylenglykol genannt) wird generell als nicht-toxisch, mit geringen systemischen Effekten bewertet [227,228]. DMSO und Formamid können dagegen, abhängig von der Dosis und Temperatur, toxische Wirkungen auf Zellen und Organismen haben [227,229]. In der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Katja Schenke-Layland laufen bereits Untersuchungen mittels Raman-Spektroskopie zum Verbleib dieser Substanzen im Gewebe nach IFC, wodurch die einleitende Fragestellung adressiert wird.

Insgesamt zeigen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass die Konservierungsmethode im Allgemeinen bzw. die Art der Kryokonservierung im Speziellen einen maßgeblichen Einfluss auf die Reaktion des Immunsystems auf transplantierte Gewebe hat. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit markieren wichtige Schritte auf dem Weg zur klinischen Anwendung der IFC-Methode und leisten somit einen Beitrag zur Verbesserung der Konservierungsstrategien für kardiovaskuläre Transplantate.

Literaturverzeichnis

- [1] R. E. Gross, E. Hurwitt, E. S. Bill, and C. E. Peirce, "Preliminary Observations on the Use of Human Arterial Grafts in the Treatment of Certain Cardiovascular Defects," *The New England Journal of Medicine*, vol. 239, pp. 578–579, oct 1948.
- [2] R. E. Gross, A. H. Bill, and E. C. Pierce, "Methods for preservation and transplantation of arterial grafts: Observations on arterial grafts in dogs: Report of transplantation of preserved arterial grafts in nine human cases," *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, vol. 88, pp. 689–701, jun 1949.
- [3] G. Murray, W. Roschlau, and W. Loughheed, "Homologous aortic-valve-segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency," *Angiology*, vol. 7, pp. 466–471, oct 1956.
- [4] D. N. Ross, "Homograft Replacement of the aortic valve," *The Lancet*, vol. 280, p. 487, sep 1962.
- [5] A. Gerhard, E. Jürgen, K. Joachim, and M. Siegfried, *Duale Reihe Anatomie*. Thieme Verlag, 2007.
- [6] A. Rutkovskiy, A. Malashicheva, G. Sullivan, M. Bogdanova, A. Kostareva, K. O. Stensløkken, A. Fiane, and J. Vaage, "Valve interstitial cells: The key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification," *Journal of the American Heart Association*, vol. 6, sep 2017.
- [7] Jakov, <[https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Diagram_of_the_human_heart_\(cropped\)_de.svg&oldid=314775576](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Diagram_of_the_human_heart_(cropped)_de.svg&oldid=314775576)>. Wikimedia Commons, the free media repository (heruntergeladen am 16.07.2018).
- [8] D. L. Mulholland and A. I. Gotlieb, "Cell biology of valvular interstitial cells.," *The Canadian journal of cardiology*, vol. 12, pp. 231–6, mar 1996.
- [9] S. A. Dreger, P. M. Taylor, S. P. Allen, and M. H. Yacoub, "Profile and localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves.," *The Journal of heart valve disease*, vol. 11, pp. 875–80, nov 2002.
- [10] H. Ma, A. R. Killaars, F. W. DelRio, C. Yang, and K. S. Anseth, "Myofibroblastic activation of valvular interstitial cells is modulated by spatial variations in matrix elasticity and its organization," *Biomaterials*, vol. 131, pp. 131–144, jul 2017.

-
- [11] F. J. Schoen, “Evolving concepts of cardiac valve dynamics: The continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering,” *Circulation*, vol. 118, pp. 1864–1880, 2008.
- [12] J. A. Leopold, “Cellular mechanisms of aortic valve calcification,” *Circulation: Cardiovascular Interventions*, vol. 5, pp. 605–614, aug 2012.
- [13] J. T. Butcher, A. M. Penrod, A. J. García, and R. M. Nerem, “Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, pp. 1429–1434, aug 2004.
- [14] J. S. Pober and G. Tellides, “Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses,” *Trends in Immunology*, vol. 33, pp. 49–57, jan 2012.
- [15] BruceBlaus, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png&oldid=284404447>. Medical gallery of Blausen Medical 2014. WikiJournal of Medicine (heruntergeladen am 16.07.2018).
- [16] E. von Willebrand, I. Lautenschlager, K. Inkinen, V.-P. Lehto, I. Virtanen, and P. Häyry, “Distribution of the major histocompatibility complex antigens in human and rat kidney,” *Kidney International*, vol. 27, pp. 616–621, apr 1985.
- [17] P. Abrahimi, R. Liu, and J. S. Pober, “Blood vessels in allotransplantation,” *American Journal of Transplantation*, vol. 15, pp. 1748–1754, jul 2015.
- [18] G. Wang, L. Jacquet, E. Karamariti, and Q. Xu, “Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells,” *The Journal of Physiology*, vol. 593, pp. 3013–3030, jul 2015.
- [19] S. Lim and S. Park, “Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis,” *BMB reports*, vol. 47, pp. 1–7, jan 2014.
- [20] A. Beckmann, A.-K. Funkat, J. Lewandowski, M. Frie, M. Ernst, K. Hekmat, W. Schiller, J. Gummert, and W. Harringer, “German Heart Surgery Report 2016: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery,” *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, vol. 65, pp. 505–518, oct 2017.
- [21] H. Oxenham, P. Bloomfield, D. J. Wheatley, R. J. Lee, J. Cunningham, R. J. Prescott, and H. C. Miller, “Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses,” *Heart*, vol. 89, pp. 715–21, jul 2003.
- [22] K. Hammermeister, G. K. Sethi, W. G. Henderson, F. L. Grover, C. Oprian, and S. H. Rahimtoola, “Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 36, pp. 1152–8, oct 2000.
- [23] S. J. Head, M. Çelik, and A. P. Kappetein, “Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement,” *European Heart Journal*, vol. 2, pp. 1–13, apr 2017.

- [24] A. Ciubotaru, S. Cebotari, I. Tudorache, E. Beckmann, A. Hilfiker, and A. Haverich, “Biological heart valves,” *Biomedizinische Technik*, vol. 58, pp. 389–397, oct 2013.
- [25] V. Chan, B. K. Lam, F. D. Rubens, P. Hendry, R. Masters, T. G. Mesana, and M. Ruel, “Long-term evaluation of biological versus mechanical prosthesis use at reoperative aortic valve replacement,” *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 144, pp. 146–151, jul 2012.
- [26] I. C. Tuna, T. A. Orszulak, H. V. Schaff, and G. K. Danielson, “Results of homograft aortic valve replacement for active endocarditis,” *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 49, pp. 619–624, apr 1990.
- [27] E. M. Delmo Walter, T. M. de By, R. Meyer, and R. Hetzer, “The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin,” *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*, vol. 4, pp. 97–108, 2012.
- [28] J. Chlupáč, E. Filová, and L. Bačáková, “Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery,” *Physiological Research*, vol. 58, pp. 119–140, 2009.
- [29] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, and F. Claeysens, “The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future,” *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 22, 2015.
- [30] R. Jashari, B. Van Hoeck, R. Ngakam, Y. Goffin, and Y. Fan, “Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels,” *Cell and Tissue Banking*, vol. 14, pp. 589–599, dec 2013.
- [31] M. E. Rendal-Vázquez, A. San Luis Verdes, J. Pombo Otero, R. Segura Iglesias, N. Domenech García, and C. Andiön Núñez, “Anatomopathological and immunohistochemical study of explanted cryopreserved arteries,” *Annals of vascular surgery*, vol. 26, pp. 720–728, 2012.
- [32] E. Kieffer, D. Gomes, L. Chiche, M. H. Fléron, F. Koskas, and A. Bahnini, “Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection: Early and late results in 179 patients,” *Journal of Vascular Surgery*, vol. 39, pp. 1009–1017, 2004.
- [33] S. H. Kim, S. Hwang, T. Y. Ha, G. W. Song, D. H. Jung, C. S. Ahn, D. B. Moon, K. H. Kim, G. C. Park, and S. G. Lee, “Usability of Cryopreserved Aortic Allografts for Middle Hepatic Vein Reconstruction During Living-Donor Liver Transplantation,” *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 20, pp. 1049–1055, may 2016.
- [34] K. Ito, N. Akamatsu, J. Togashi, S. Tamura, Y. Sakamoto, K. Hasegawa, and N. Kokudo, “Outflow Reconstruction Using Cryopreserved Homologous Venous Grafts in Living Donor Liver Transplantation,” *Transplantation Proceedings*, vol. 49, pp. 109–114, jan 2017.

- [35] C. C. Jadowiec, M. Lavallee, E. M. Mannion, and M. G. Brown, “An Outcomes Comparison of Native Arteriovenous Fistulae, Polytetrafluorethylene Grafts, and Cryopreserved Vein Allografts,” *Annals of Vascular Surgery*, vol. 29, pp. 1642–1647, nov 2015.
- [36] T. Y. Ha, Y. H. Kim, J. W. Chang, Y. Park, Y. Han, H. Kwon, T. W. Kwon, D. J. Han, Y. P. Cho, and S. G. Lee, “Clinical Outcomes of Cryopreserved Arterial Allograft Used as a Vascular Conduit for Hemodialysis,” *Journal of Korean medical science*, vol. 31, pp. 1266–1272, aug 2016.
- [37] S. Lal, A. Li, D. Allen, P. D. Allen, P. Bannon, T. Cartmill, R. Cooke, A. Farnsworth, A. Keogh, and C. dos Remedios, “Best practice BioBanking of human heart tissue,” *Biophysical Reviews*, vol. 7, pp. 399–406, dec 2015.
- [38] T. H. Jang, S. C. Park, J. H. Yang, J. Y. Kim, J. H. Seok, U. S. Park, C. W. Choi, S. R. Lee, and J. Han, “Cryopreservation and its clinical applications,” *Integrative Medicine Research*, vol. 6, pp. 12–18, 2017.
- [39] K. G. M. Brockbank, G. J. Wright, H. Yao, E. D. Greene, Z. Z. Chen, and K. Schenke-Layland, “Allogeneic heart valve storage above the glass transition at -80 degree Celsius,” *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 91, pp. 1829–1835, jun 2011.
- [40] F. Nappi, A. Nenna, T. Petitti, C. Spadaccio, I. Gambardella, M. Lusini, M. Chello, and C. Acar, “Long-term outcome of cryopreserved allograft for aortic valve replacement,” *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2018.
- [41] D. Bell, S. Prabhu, K. S. Betts, Y. Chen, D. Radford, C. Whight, C. Ward, H. Jalali, P. Venugopal, and N. Alphonso, “Long-term performance of homografts versus stented bioprosthetic valves in the pulmonary position in patients aged 10-20 years,” *Eur J Cardiothorac Surg*, pp. 1–7, 2018.
- [42] E. Minga Lowampa, C. Holemans, L. Stiennon, H. Van Damme, and J. O. Defraigne, “Late Fate of Cryopreserved Arterial Allografts,” *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 52, pp. 696–702, nov 2016.
- [43] A. C. Yankah, V. Alexi-Meskishvili, Y. Weng, K. Schorn, P. E. Lange, and R. Hetzer, “Accelerated degeneration of allografts in the first two years of life,” *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 60, aug 1995.
- [44] K. Schenke-Layland, N. Madershahian, I. Riemann, B. Starcher, K. J. Halbhuber, K. König, and U. A. Stock, “Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets,” *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 81, pp. 918–926, mar 2006.
- [45] M. Votteler, D. A. Carvajal Berrio, M. Pudlas, H. Walles, U. A. Stock, and K. Schenke-Layland, “Raman spectroscopy for the non-contact and non-destructive monitoring of collagen damage within tissues,” *Journal of Biophotonics*, vol. 5, pp. 47–56, jan 2012.

- [46] F. J. Schoen and R. J. Levy, "Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 79, pp. 1072–1080, mar 2005.
- [47] K. G. M. Brockbank, F. G. Lightfoot, Y. C. Song, and M. J. Taylor, "Interstitial ice formation in cryopreserved homografts: A possible cause of tissue deterioration and calcification in vivo," *Journal of Heart Valve Disease*, vol. 9, pp. 200–206, mar 2000.
- [48] K. G. M. Brockbank, Y. C. Song, B. S. Khirabadi, F. G. Lightfoot, J. M. Boggs, and M. J. Taylor, "Storage of tissues by vitrification," *Transplantation Proceedings*, vol. 32, pp. 3–4, feb 2000.
- [49] K. Schenke-Layland, J. Xie, S. Heydarkhan-Hagvall, S. F. Hamm-Alvarez, U. A. Stock, K. G. Brockbank, and W. R. MacLellan, "Optimized Preservation of Extracellular Matrix in Cardiac Tissues: Implications for Long-Term Graft Durability," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 83, pp. 1641–1650, 2007.
- [50] A. J. T. Huber, K. G. M. Brockbank, I. Riemann, M. Schleicher, K. Schenke-Layland, O. Fritze, H. P. Wendel, and U. A. Stock, "Preclinical evaluation of ice-free cryopreserved arteries: Structural integrity and hemocompatibility," *Cells Tissues Organs*, vol. 196, pp. 262–270, jan 2012.
- [51] M. Lisy, J. Pennecke, K. G. M. Brockbank, O. Fritze, M. Schleicher, K. Schenke-Layland, R. Kaulitz, I. Riemann, C. N. Weber, J. Braun, K. E. Mueller, F. Fend, T. Scheunert, A. D. Gruber, J. M. Albes, A. J. Huber, and U. A. Stock, "The performance of ice-free cryopreserved heart valve allografts in an orthotopic pulmonary sheep model," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 5306–5311, jul 2010.
- [52] A. C. Biermann, J. Marzi, E. Brauchle, M. Schneider, A. Kornberger, S. Abdelaziz, J. L. Wichmann, C. T. Arendt, E. Nagel, K. G. M. Brockbank, M. Seifert, K. Schenke-Layland, and U. A. Stock, "Impact of T-cell-mediated immune response on xenogeneic heart valve transplantation: Short-term success and mid-term failure," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 53, pp. 784–792, nov 2017.
- [53] A. C. Biermann, J. Marzi, E. Brauchle, J. L. Wichmann, C. T. Arendt, V. Puntmann, E. Nagel, S. Abdelaziz, A. G. Winter, K. G. M. Brockbank, S. Layland, K. Schenke-Layland, and U. A. Stock, "Improved long-term durability of allogeneic heart valves in the orthotopic sheep model," *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, aug 2018.
- [54] M. Seifert, A. Bayrak, M. Stolk, N. Souidi, M. Schneider, U. A. Stock, and K. G. M. Brockbank, "Xeno-immunogenicity of ice-free cryopreserved porcine leaflets," *Journal of Surgical Research*, vol. 193, pp. 933–941, feb 2015.
- [55] E. C. T. Yeung, C. Stasolla, M. J. Sumner, and B. Q. Huang, *Chapter 2: Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview*. Plant Microtechniques and Protocols, 2015.

- [56] J. Hülsmann, K. Grün, S. El Amouri, M. Barth, K. Hornung, C. Holzfuß, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, "Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing," *Xenotransplantation*, vol. 19, pp. 286–297, sep 2012.
- [57] R. F. Siddiqui, J. R. Abraham, and J. Butany, "Bioprosthetic heart valves: modes of failure," *Histopathology*, vol. 55, pp. 135–144, aug 2009.
- [58] D. J. Kim, Y. J. Kim, W. H. Kim, and S. H. Kim, "Xenograft failure of pulmonary valved conduit cross-linked with glutaraldehyde or not cross-linked in a pig to goat implantation model," *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 45, pp. 287–294, oct 2012.
- [59] R. A. Manji, L. F. Zhu, N. K. Nijjar, D. C. Rayner, G. S. Korbitt, T. A. Churchill, R. V. Rajotte, A. Koshal, and D. B. Ross, "Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection," *Circulation*, vol. 114, pp. 318–327, jul 2006.
- [60] M. Grabenwoger, F. Fitzal, C. Gross, D. Hutschala, P. Bock, P. Brucke, and E. Wolner, "Different modes of degeneration in autologous and heterologous heart valve prostheses," *The Journal of heart valve disease*, vol. 9, pp. 101–104, jan 2000.
- [61] S. Gabbay, U. Bortolotti, S. Factor, D. F. Shore, and R. W. Frater, "Calcification of implanted xenograft pericardium. Influence of site and function," *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 87, pp. 782–7, may 1984.
- [62] E. Fioretta, L. von Boehmer, S. Motta, V. Lintas, S. Hoerstrup, and M. Emmert, "Cardiovascular tissue engineering: From basic science to clinical application," *Experimental Gerontology*, mar 2018.
- [63] M. Carrabba and P. Madeddu, "Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 6, p. 41, apr 2018.
- [64] B. Weber et al., "Injectable living marrow stromal cell-based autologous tissue engineered heart valves: first experiences with a one-step intervention in primates," *European Heart Journal*, vol. 32, pp. 2830–2840, nov 2011.
- [65] T. Yokota, H. Ichikawa, G. Matsumiya, T. Kuratani, T. Sakaguchi, S. Iwai, Y. Shirakawa, K. Torikai, A. Saito, E. Uchimura, N. Kawaguchi, N. Matsuura, and Y. Sawa, "In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding," *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 136, pp. 900–907, oct 2008.
- [66] C. K. Hashi, Y. Zhu, G.-Y. Yang, W. L. Young, B. S. Hsiao, K. Wang, B. Chu, and S. Li, "Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, pp. 11915–11920, jul 2007.

- [67] S. P. Hoerstrup, I. Cummings, M. Lachat, F. J. Schoen, R. Jenni, S. Leschka, S. Neuenchwander, D. Schmidt, A. Mol, C. Günter, M. Gössi, M. Genoni, and G. Zund, “Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: Follow-up at 100 weeks in a large animal model,” *Circulation*, vol. 114, jul 2006.
- [68] Comparison of the Human Acellular Vessel (HAV) With Fistulas as Conduits for Hemodialysis, <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03183245>>. U.S. National Library of Medicine (Stand 21.07.2018).
- [69] J. H. Lawson, M. H. Glickman, M. Ilzecki, T. Jakimowicz, A. Jaroszynski, E. K. Peden, A. J. Pilgrim, H. L. Prichard, M. Guzewicz, S. Przywara, J. Szmidt, J. Turek, W. Witkiewicz, N. Zapotoczny, T. Zubilewicz, and L. E. Niklason, “Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: two phase 2 single-arm trials,” *The Lancet*, vol. 387, pp. 2026–2034, may 2016.
- [70] P. Lindsey, A. Echeverria, M. Cheung, E. Kfoury, C. F. Bechara, and P. H. Lin, “Lower Extremity Bypass Using Bovine Carotid Artery Graft (Artegraft): An Analysis of 124 Cases with Long-Term Results,” *World journal of surgery*, vol. 42, pp. 295–301, jan 2018.
- [71] P. Wu, N. Nakamura, T. Kimura, K. Nam, T. Fujisato, S. Funamoto, T. Higami, and A. Kishida, “Decellularized porcine aortic intima-media as a potential cardiovascular biomaterial,” *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, vol. 21, pp. 189–194, aug 2015.
- [72] M. Olausson, P. B. Patil, V. K. Kuna, P. Chougule, N. Hernandez, K. Methe, C. Kullberg-Lindh, H. Borg, H. Ejnell, and S. Sumitran-Holgersson, “Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: A proof-of-concept study,” *The Lancet*, vol. 380, pp. 230–237, jul 2012.
- [73] G. Perri, A. Polito, C. Esposito, S. B. Albanese, P. Francalanci, G. Pongiglione, and A. Carotti, “Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease,” *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 41, pp. 1320–1325, jun 2012.
- [74] P. Simon, M. T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar, E. Rieder, and E. Wolner, “Early failure of the tissue engineered porcine heart valve Synergraft in pediatric patients,” *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 23, pp. 1002–1006, jun 2003.
- [75] S. Bibevski, M. Ruzmetov, R. S. Fortuna, M. W. Turrentine, J. W. Brown, and R. G. Ohye, “Performance of SynerGraft Decellularized Pulmonary Allografts Compared With Standard Cryopreserved Allografts: Results From Multiinstitutional Data,” *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 103, pp. 869–874, 2017.

- [76] I. Tudorache, A. Horke, S. Cebotari, S. Sarikouch, D. Boethig, T. Breyman, P. Berbaum, H. Bertram, M. Westhoff-Bleck, K. Theodoridis, D. Bobylev, E. Cheptanaru, A. Ciubotaru, and A. Haverich, "Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 50, pp. 89–97, jul 2016.
- [77] J. W. Brown, M. Ruzmetov, O. Eltayeb, M. D. Rodefeld, and M. W. Turrentine, "Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 91, pp. 416–423, feb 2011.
- [78] M. R. Helder, N. T. Kouchoukos, K. Zehr, J. A. Dearani, J. J. Maleszewski, C. Leduc, C. N. Heins, and H. V. Schaff, "Late durability of decellularized allografts for aortic valve replacement: A word of caution," in *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 152, pp. 1197–1199, oct 2016.
- [79] R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, F. Oppenhuizen, C. J. Van Munsteren, A. C. Gittenberger-De Groot, and M. C. DeRuiter, "Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 27, pp. 566–571, 2005.
- [80] M. T. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel, and P. Simon, "Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves," *International Journal of Artificial Organs*, vol. 26, pp. 421–427, may 2003.
- [81] G. Y. Chen and G. Nuñez, "Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, pp. 826–837, dec 2010.
- [82] Z. Julier, A. J. Park, P. S. Briquez, and M. M. Martino, "Promoting tissue regeneration by modulating the immune system," *Acta Biomaterialia*, vol. 53, pp. 13–28, 2017.
- [83] S. van Loon, A. Smits, A. Driessen-Mol, F. Baaijens, and C. Bouten, "The Immune Response in in situ Tissue Engineering of Aortic Heart Valves," *Calcific aortic disease*, pp. 207–245, 2013.
- [84] M. B. Gorbet and M. V. Sefton, "Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 5681–5703, nov 2004.
- [85] S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber, and J. C. Simon, "Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 6692–6709, oct 2011.
- [86] B. Nilsson, K. N. Ekdahl, T. E. Mollnes, and J. D. Lambris, "The role of complement in biomaterial-induced inflammation," *Molecular Immunology*, vol. 44, pp. 82–94, jan 2007.
- [87] C. A. Diebolder et al., "Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface," *Science*, vol. 343, pp. 1260–1263, mar 2014.

- [88] J. V. Sarma and P. A. Ward, "The complement system," *Cell and Tissue Research*, vol. 343, pp. 227–235, jan 2011.
- [89] A. H. Rahman, D. K. Taylor, and L. A. Turka, "The contribution of direct TLR signaling to T cell responses," *Immunologic Research*, vol. 45, pp. 25–36, oct 2009.
- [90] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses," *Nature Immunology*, vol. 5, pp. 987–995, oct 2004.
- [91] M. Yu, H. Wang, A. Ding, D. T. Golenbock, E. Latz, C. J. Czura, M. J. Fenton, K. J. Tracey, and H. Yang, "HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2," *Shock*, vol. 26, pp. 174–179, aug 2006.
- [92] R. M. Vabulas, P. Ahmad-Nejad, C. Da Costa, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Häcker, and H. Wagner, "Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 31332–31339, aug 2001.
- [93] N. A. Turner, A. Das, D. J. O'Regan, S. G. Ball, and K. E. Porter, "Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 43, pp. 1450–1458, oct 2011.
- [94] D. A. Rao, R. E. Eid, L. Qin, T. Yi, N. C. Kirkiles-Smith, G. Tellides, and J. S. Pober, "Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, pp. 3145–3158, dec 2008.
- [95] T. L. Adair-Kirk and R. M. Senior, "Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40, pp. 1101–1110, jun 2008.
- [96] K. R. Taylor, K. Yamasaki, K. A. Radek, A. D. Nardo, H. Goodarzi, D. Golenbock, B. Beutler, and R. L. Gallo, "Recognition of Hyaluronan Released in Sterile Injury Involves a Unique Receptor Complex Dependent on Toll-like Receptor 4, CD44, and MD-2," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 18265–18275, jun 2007.
- [97] K. A. Scheibner, M. A. Lutz, S. Boodoo, M. J. Fenton, J. D. Powell, and M. R. Horton, "Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2," *The Journal of Immunology*, vol. 177, pp. 1272–1281, jul 2006.
- [98] L. Schaefer, A. Babelova, E. Kiss, H.-J. Haussler, M. Baliova, M. Krzyzankova, G. Marsche, M. F. Young, D. Mihalik, M. Götte, E. Malle, R. M. Schaefer, and H.-J. Gröne, "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, pp. 2223–2233, aug 2005.

- [99] N. M. Weathington, A. H. Van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp, and J. E. Blalock, “A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation,” *Nature Medicine*, vol. 12, pp. 317–323, mar 2006.
- [100] R. M. Senior, A. Hinek, G. L. Griffin, D. J. Pipoly, E. C. Crouch, and R. P. Mecham, “Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties.,” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 1, pp. 479–87, dec 1989.
- [101] M. B. Gorbet and M. V. Sefton, “Endotoxin: The uninvited guest,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 6811–6817, 2005.
- [102] B. Geering, C. Stoeckle, S. Conus, and H.-U. Simon, “Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils,” *Trends in Immunology*, vol. 34, pp. 398–409, aug 2013.
- [103] F. Colotta, F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani, “Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.,” *Blood*, vol. 80, no. 8, pp. 2012–20, 1992.
- [104] G. S. Selders, A. E. Fetz, M. Z. Radic, and G. L. Bowlin, “An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration,” *Regenerative Biomaterials*, vol. 4, pp. 55–68, feb 2017.
- [105] O. Soehnlein and L. Lindbom, “Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, pp. 427–439, jun 2010.
- [106] C. Nathan, “Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, pp. 173–182, 2006.
- [107] A. Mantovani, M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon, “Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, pp. 519–531, aug 2011.
- [108] H. Nozawa, C. Chiu, and D. Hanahan, “Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 12493–12498, aug 2006.
- [109] S. Tazzyman, H. Niaz, and C. Murdoch, “Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: Subversion of immune responses to promote tumour growth,” *Seminars in Cancer Biology*, vol. 23, pp. 149–158, jun 2013.
- [110] M. Horckmans, L. Ring, J. Duchene, D. Santovito, M. J. Schloss, M. Drechsler, C. Weber, O. Soehnlein, and S. Steffens, “Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype.,” *European heart journal*, vol. 38, pp. 187–197, feb 2017.

- [111] Y. Ma, A. Yabluchanskiy, R. P. Iyer, P. L. Cannon, E. R. Flynn, M. Jung, J. Henry, C. A. Cates, K. Y. Deleon-Pennell, and M. L. Lindsey, "Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction," *Cardiovascular Research*, vol. 110, pp. 51–61, 2016.
- [112] J. Schmielau and O. J. Finn, "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients.," *Cancer research*, vol. 61, pp. 4756–60, jun 2001.
- [113] A. Chalaris, B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller, "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils.," *Blood*, vol. 110, pp. 1748–55, sep 2007.
- [114] M. Romano, M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Fagioni, W. Luini, V. Van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani, "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment," *Immunity*, vol. 6, pp. 315–325, mar 1997.
- [115] T. Taga, M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto, "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.," *Cell*, vol. 58, pp. 573–81, aug 1989.
- [116] S. M. Hurst, T. S. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley, and S. A. Jones, "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation," *Immunity*, vol. 14, pp. 705–714, jun 2001.
- [117] P. Italiani and D. Boraschi, "Development and Functional Differentiation of Tissue-Resident Versus Monocyte-Derived Macrophages in Inflammatory Reactions," in *Results and problems in cell differentiation*, vol. 62, pp. 23–43, 2017.
- [118] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz, "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood," *Blood*, vol. 116, pp. e74–80, oct 2010.
- [119] L. Ziegler-Heitbrock, "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, pp. 584–592, mar 2006.
- [120] K. Rzeniewicz, A. Newe, A. Rey Gallardo, J. Davies, M. R. Holt, A. Patel, G. T. Charas, B. Stramer, C. Molenaar, T. F. Tedder, M. Parsons, and A. Ivetic, "L-selectin shedding is activated specifically within transmigrating pseudopods of monocytes to regulate cell polarity in vitro," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, mar 2015.

- [121] F. Tacke, D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht, and G. J. Randolph, "Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 117, pp. 185–94, jan 2007.
- [122] S. Sprangers, T. J. Vries, and V. Everts, "Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells," *Journal of Immunology Research*, 2016.
- [123] P. J. Murray et al., "Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines," *Immunity*, vol. 41, pp. 14–20, jul 2014.
- [124] A. Mantovani, S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica, and M. Locati, "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling," *Journal of Pathology*, vol. 229, pp. 176–185, jan 2013.
- [125] B. N. Brown, B. D. Ratner, S. B. Goodman, S. Amar, and S. F. Badylak, "Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine," *Biomaterials*, vol. 33, pp. 3792–3802, may 2012.
- [126] B. N. Brown and S. F. Badylak, "Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, pp. 4948–4955, feb 2013.
- [127] A. Sica, M. Erreni, P. Allavena, and C. Porta, "Macrophage polarization in pathology," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, pp. 4111–4126, jul 2015.
- [128] D. Hachim, N. Wang, S. T. Lopresti, E. C. Stahl, Y. U. Umeda, R. D. Rege, S. T. Carey, D. Mani, and B. N. Brown, "Effects of aging upon the host response to implants," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 105, pp. 1281–1292, jan 2017.
- [129] S. Tedesco, C. Bolego, A. Toniolo, A. Nassi, G. P. Fadini, M. Locati, and A. Cignarella, "Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages," *Immunobiology*, vol. 220, pp. 545–554, may 2015.
- [130] G. A. Duque and A. Descoteaux, "Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, pp. 1–12, 2014.
- [131] A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, O. Politz, C. E. Orfanos, K. Schledzewski, and S. Goerdts, "Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein β IG-H3," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 53, pp. 386–392, apr 2001.

- [132] S. K. Madala, J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, M. S. Wilson, S. Minniccozzi, A. W. Cheever, R. W. Thompson, M. M. Mentink-Kane, and T. A. Wynn, "Matrix Metalloproteinase 12-Deficiency Augments Extracellular Matrix Degrading Metalloproteinases and Attenuates IL-13-Dependent Fibrosis," *The Journal of Immunology*, vol. 184, pp. 3955–3963, apr 2010.
- [133] L. A. Murray, Q. Chen, M. S. Kramer, D. P. Hesson, R. L. Argentieri, X. Peng, M. Gulati, R. J. Homer, T. Russell, N. Van Rooijen, J. A. Elias, C. M. Hogaboam, and E. L. Herzog, "TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 43, pp. 154–162, jan 2011.
- [134] M. Schnoor, P. Cullen, J. Lorkowski, K. Stolle, H. Robenek, D. Troyer, J. Rauterberg, and S. Lorkowski, "Production of Type VI Collagen by Human Macrophages: A New Dimension in Macrophage Functional Heterogeneity," *The Journal of Immunology*, vol. 180, pp. 5707–5719, apr 2008.
- [135] Y. Wang, M. Wehling-Henricks, G. Samengo, and J. G. Tidball, "Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide," *Aging Cell*, vol. 14, pp. 678–688, aug 2015.
- [136] R. F. Diegelmann and M. C. Evans, "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing," *Frontiers in Bioscience*, vol. 9, p. 283, jan 2004.
- [137] G. Zizzo, B. A. Hilliard, M. Monestier, and P. L. Cohen, "Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction," *Journal of Immunology*, vol. 189, pp. 3508–3520, oct 2012.
- [138] G. W. Tu, Y. Shi, Y. J. Zheng, H.-y. He, G. G. Ma, G. W. Hao, and Z. Luo, "Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage," *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, p. 181, dec 2017.
- [139] J. Lu, Q. Cao, D. Zheng, Y. Sun, C. Wang, X. Yu, Y. Wang, V. W. Lee, G. Zheng, T. K. Tan, X. Wang, S. I. Alexander, D. C. Harris, and Y. Wang, "Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease," *Kidney International*, vol. 84, pp. 745–755, oct 2013.
- [140] G. Tellides and J. S. Pober, "Inflammatory and immune responses in the arterial media," *Circulation Research*, vol. 116, pp. 312–322, 2015.
- [141] A. G. Murray, P. Libby, and J. S. Pober, "Human vascular smooth muscle cells poorly co-stimulate and actively inhibit allogeneic CD4+ T cell proliferation in vitro.," *Journal of immunology*, vol. 154, pp. 151–61, jan 1995.
- [142] P. Zhang, T. D. Manes, J. S. Pober, and G. Tellides, "Human vascular smooth muscle cells lack essential costimulatory molecules to activate allogeneic memory T cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, pp. 1795–1801, sep 2010.

- [143] S. Reinke, S. Geissler, W. R. Taylor, K. Schmidt-Bleek, K. Juelke, V. Schwachmeyer, M. Dahne, T. Hartwig, L. Akyuz, C. Meisel, N. Unterwalder, N. B. Singh, P. Reinke, N. P. Haas, H.-D. Volk, and G. N. Duda, "Terminally Differentiated CD8+ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans," *Science Translational Medicine*, vol. 5, mar 2013.
- [144] Y. Liu, L. Wang, T. Kikuri, K. Akiyama, C. Chen, X. Xu, R. Yang, W. J. Chen, S. Wang, and S. Shi, "Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α ," *Nature Medicine*, vol. 17, pp. 1594–1601, dec 2011.
- [145] H. Lei, K. Schmidt-Bleek, A. Dienelt, P. Reinke, and H. D. Volk, "Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 6, p. 184, sep 2015.
- [146] X. Meng, J. Yang, M. Dong, K. Zhang, E. Tu, Q. Gao, W. Chen, C. Zhang, and Y. Zhang, "Regulatory T cells in cardiovascular diseases," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 13, pp. 167–179, mar 2016.
- [147] J. Weirather, U. D. W. Hofmann, N. Beyersdorf, G. C. Ramos, B. Vogel, A. Frey, G. Ertl, T. Kerkau, and S. Frantz, "Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation," *Circulation Research*, vol. 115, pp. 55–67, jun 2014.
- [148] A. Mor, G. Luboshits, D. Planer, G. Keren, and J. George, "Altered status of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes," *European Heart Journal*, vol. 27, pp. 2530–2537, sep 2006.
- [149] T. Emoto, N. Sasaki, T. Yamashita, K. Kasahara, K. Yodoi, Y. Sasaki, T. Matsumoto, T. Mizoguchi, and K.-i. Hirata, "Regulatory/Effector T-Cell Ratio Is Reduced in Coronary Artery Disease," *Circulation Journal*, vol. 78, pp. 2935–2941, 2014.
- [150] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nature methods*, vol. 9, pp. 676–82, jun 2012.
- [151] R. Gilbert, M. Vickaryous, and A. Vilorio-Petit, "Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration," *Journal of Developmental Biology*, vol. 4, p. 21, jun 2016.
- [152] K. Fujio, T. Komai, M. Inoue, K. Morita, T. Okamura, and K. Yamamoto, "Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines," *Autoimmunity Reviews*, vol. 15, pp. 917–922, 2016.
- [153] A. Kelly, S. A. Houston, E. Sherwood, J. Casulli, and M. A. Travis, "Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β ," *Advances in Immunology*, vol. 134, pp. 137–233, 2017.

- [154] H. F. Zhou, H. Yan, P. Bertram, Y. Hu, L. E. Springer, R. W. Thompson, J. A. Curci, D. E. Hourcade, and C. T. N. Pham, “Fibrinogen-specific antibody induces abdominal aortic aneurysm in mice through complement lectin pathway activation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, 2013.
- [155] D. Kolbus, O. H. Ramos, K. E. Berg, J. Persson, M. Wigren, H. Björkbacka, G. Fredrikson, and J. Nilsson, “CD8+ T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe^{-/-} mice,” *BMC Immunology*, vol. 11, p. 58, dec 2010.
- [156] A. Sugaya, Y. Misawa, S. I. Ohki, I. Takazawa, and S. Uesugi, “A case of immunoglobulin G4-related aortic diseases,” *Clinical Case Reports*, vol. 6, pp. 606–608, apr 2018.
- [157] F. Bastian, M. E. Stelzmüller, K. Kratochwill, M. T. Kasimir, P. Simon, and G. Weigel, “IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue,” *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1824–1832, apr 2008.
- [158] M. Jaguin, N. Houlbert, O. Fardel, and V. Lecureur, “Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin,” *Cellular Immunology*, vol. 281, pp. 51–61, jan 2013.
- [159] S. Giwa et al., “The promise of organ and tissue preservation to transform medicine,” *Nature Biotechnology*, vol. 35, pp. 530–542, 2017.
- [160] A. J. T. Huber, T. Aberle, M. Schleicher, H. P. Wendel, and K. G. M. Brockbank, “Characterization of a simplified ice-free cryopreservation method for heart valves,” *Cell and Tissue Banking*, vol. 14, pp. 195–203, jun 2013.
- [161] F. M. Lupinetti, T. T. Tsai, J. M. Kneebone, and E. L. Bove, “Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts,” *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 106, pp. 912–7, nov 1993.
- [162] S. L. Shiao, J. M. McNiff, and J. S. Pober, “Memory T Cells and Their Costimulators in Human Allograft Injury,” *The Journal of Immunology*, vol. 175, pp. 4886–4896, oct 2005.
- [163] C. C. Hughes, C. O. Savage, and J. S. Pober, “Endothelial cells augment T cell interleukin 2 production by a contact-dependent mechanism involving CD2/LFA-3 interaction,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 171, pp. 1453–67, may 1990.
- [164] A. Neumann, S. Sarikouch, T. Breyman, S. Cebotari, D. Boethig, A. Horke, P. Berbaum, M. Westhoff-Bleck, H. Bertram, M. Ono, I. Tudorache, A. Haverich, and G. Beutel, “Early Systemic Cellular Immune Response in Children and Young Adults Receiving Decellularized Fresh Allografts for Pulmonary Valve Replacement,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 20, pp. 1003–1011, mar 2014.

- [165] P. Batten, A. M. McCormack, M. L. Rose, and M. H. Yacoub, "Valve interstitial cells induce donor-specific T-cell anergy," *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 122, pp. 129–135, 2001.
- [166] Food and Drug Administration (FDA), "Guidance for Industry - FDA's Strategy on Antimicrobial Resistance - Questions and Answers.," <<https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm216939.htm>>, vol. 1, 2016.
- [167] V. J. Ferrans, T. L. Spray, M. E. Billingham, and W. C. Roberts, "Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. Transmission and scanning electron microscopic observations in 12 patients," *The American Journal of Cardiology*, vol. 41, pp. 1159–1184, jun 1978.
- [168] K. G. M. Brockbank and Y. C. Song, "Mechanisms of bioprosthetic heart valve calcification.," *Transplantation*, vol. 75, pp. 1133–5, apr 2003.
- [169] D. R. Koolbergen, M. G. Hazekamp, E. De Heer, F. Van Hoorn, H. A. Huysmans, J. A. Bruijn, and R. A. E. Dion, "Structural degeneration of pulmonary homografts used as aortic valve substitute underlines early graft failure," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 22, pp. 802–807, nov 2002.
- [170] C. J. Gerson, R. C. Elkins, S. Goldstein, and A. E. Heacox, "Structural integrity of collagen and elastin in SynerGraft® decellularized-cryopreserved human heart valves," *Cryobiology*, vol. 64, pp. 33–42, feb 2012.
- [171] M. E. Rendal Vázquez, T. M. Díaz Román, M. Rodríguez Cabarcos, C. Zavanella Botta, N. Domenech García, M. González Cuesta, M. J. Sánchez Dopico, S. Pértega Díaz, and C. Andión Núñez, "Apoptosis in fresh and cryopreserved cardiac valves of pig samples," *Cell and Tissue Banking*, vol. 9, pp. 101–107, jun 2008.
- [172] M. Raoof, Q. Zhang, K. Itagaki, and C. J. Hauser, "Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1," *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, vol. 68, pp. 1328–1332, jun 2010.
- [173] D. L. Laskin, T. Kimura, S. Sakakibara, D. J. Riley, and R. A. Berg, "Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 39, pp. 255–66, mar 1986.
- [174] A. E. Postlethwaite, "Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 143, pp. 1299–1307, jun 1976.
- [175] P. Mathieu, R. Bouchareb, and M.-C. Boulanger, "Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease.," *Journal of immunology research*, vol. 2015, may 2015.

- [176] A. M. Coughlan, S. J. Freeley, and M. G. Robson, "Humanised mice have functional human neutrophils," *Journal of Immunological Methods*, vol. 385, pp. 96–104, nov 2012.
- [177] A. K. Schröder, P. Uciechowski, D. Fleischer, and L. Rink, "Crosslinking of CD66b on Peripheral Blood Neutrophils Mediates the Release of Interleukin-8 from Intracellular Storage," *Human Immunology*, vol. 67, pp. 676–682, sep 2006.
- [178] L. Hertwig, F. Pache, S. Romero-Suarez, K. H. Stürner, N. Borisow, J. Behrens, J. Bellmann-Strobl, B. Seeger, N. Asselborn, K. Ruprecht, J. M. Millward, C. Infante-Duarte, and F. Paul, "Distinct functionality of neutrophils in multiple sclerosis and neuromyelitis optica.," *Multiple sclerosis*, vol. 22, pp. 1–14, feb 2015.
- [179] X. Z. Zhang, P. D. Paré, and A. J. Sandford, "PMN degranulation in relation to CD63 expression and genetic polymorphisms in healthy individuals and COPD patients," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 19, pp. 817–822, may 2007.
- [180] N. Sakai, T. Wada, K. Furuichi, K. Shimizu, S. Kokubo, A. Hara, J. Yamahana, T. Okumura, K. Matsushima, H. Yokoyama, and S. Kaneko, "MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, pp. 555–563, mar 2006.
- [181] M. E. Ogle, C. E. Segar, S. Sridhar, and E. A. Botchwey, "Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 241, no. 10, pp. 1084–1097, 2016.
- [182] M. T. Wolf, Y. Vodovotz, S. Tottey, B. N. Brown, and S. F. Badylak, "Predicting in vivo Responses to Biomaterials via Combined in vitro and in silico Analysis," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 21, pp. 148–159, 2015.
- [183] N. Grotenhuis, H. Vd Toom, N. Kops, Y. Bayon, E. B. Deerenberg, I. M. Mulder, G. Van Osch, J. F. Lange, and Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, "In vitro model to study the biomaterial-dependent reaction of macrophages in an inflammatory environment," *British Journal of Surgery*, vol. 101, pp. 983–992, may 2014.
- [184] M. B. Ariganello, D. T. Simionescu, R. S. Labow, and J. Michael Lee, "Macrophage differentiation and polarization on a decellularized pericardial biomaterial," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 439–449, jan 2011.
- [185] Z. Wang, Y. Cui, J. Wang, X. Yang, Y. Wu, K. Wang, X. Gao, D. Li, Y. Li, X. L. Zheng, Y. Zhu, D. Kong, and Q. Zhao, "The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(ϵ -caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration," *Biomaterials*, vol. 35, pp. 5700–5710, jul 2014.
- [186] F. Y. Mcwhorter, T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, and W. F. Liu, "Modulation of macrophage phenotype by cell shape.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, pp. 17253–8, oct 2013.

- [187] S. Féréol, R. Fodil, V. M. Laurent, E. Planus, B. Louis, G. Pelle, and D. Isabey, “Mechanical and structural assessment of cortical and deep cytoskeleton reveals substrate-dependent alveolar macrophage remodeling,” *Bio-medical materials and engineering*, vol. 18, 2008.
- [188] T. Ben-Mordechai, R. Holbova, N. Landa-Rouben, T. Harel-Adar, M. S. Feinberg, I. Abd Elrahman, G. Blum, F. H. Epstein, Z. Silman, S. Cohen, and J. Leor, “Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 62, pp. 1890–1901, nov 2013.
- [189] V. Dayan, G. Yannarelli, F. Billia, P. Filomeno, X. H. Wang, J. E. Davies, and A. Keating, “Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction,” *Basic Research in Cardiology*, vol. 106, pp. 1299–1310, nov 2011.
- [190] S. Nagasaka, S. Taniguchi, Y. Nakayama, H. Sakaguchi, K. Nishizaki, H. Naito, and H. Morioka, “In vivo study of the effects of cryopreservation on heart valve xenotransplantation,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 14, pp. 70–79, mar 2005.
- [191] T. van den Bosch, K. Caliskan, M. D. Kraaij, A. A. Constantinescu, O. C. Manintveld, P. J. M. Leenen, J. H. von der Thüsen, M. C. Clahsen-van Groningen, C. C. Baan, and A. T. Rowshani, “CD16⁺ monocytes and skewed macrophage polarization toward M2 type hallmark heart transplant acute cellular rejection,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 346, 2017.
- [192] C. Wu, Y. Zhao, X. Xiao, Y. Fan, M. Kloc, W. Liu, R. M. Ghobrial, P. Lan, X. He, and X. C. Li, “Graft-Infiltrating Macrophages Adopt an M2 Phenotype and Are Inhibited by Purinergic Receptor P2X7 Antagonist in Chronic Rejection,” *American Journal of Transplantation*, vol. 16, pp. 2563–2573, sep 2016.
- [193] G. Li, W. Qiao, W. Zhang, F. Li, J. Shi, and N. Dong, “The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification,” *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 153, feb 2017.
- [194] R. A. Manji, B. Ekser, A. H. Menkis, and D. K. C. Cooper, “Bioprosthetic heart valves of the future,” *Xenotransplantation*, vol. 21, pp. 1–10, jan 2014.
- [195] X. O. Yang, R. Nurieva, G. J. Martinez, H. S. Kang, Y. Chung, B. P. Pappu, B. Shah, S. H. Chang, K. S. Schluns, S. S. Watowich, X.-H. Feng, A. M. Jetten, and C. Dong, “Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs,” *Immunity*, vol. 29, pp. 44–56, jul 2008.
- [196] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K.-J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl, “Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, pp. 1875–1886, dec 2003.

- [197] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo, "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells," *Nature*, vol. 441, pp. 235–238, may 2006.
- [198] K. G. M. Brockbank, K. Schenke-Layland, E. D. Greene, Z. Chen, O. Fritze, M. Schleicher, R. Kaulitz, I. Riemann, F. Fend, J. M. Albes, U. A. Stock, and M. Lisy, "Ice-free cryopreservation of heart valve allografts: Better extracellular matrix preservation in vivo and preclinical results," *Cell and Tissue Banking*, vol. 13, pp. 663–671, dec 2012.
- [199] K. Schenke-Layland, J. Xie, S. Heydarkhan-Hagvall, S. F. Hamm-Alvarez, U. A. Stock, K. G. Brockbank, and W. R. MacLellan, "Optimized Preservation of Extracellular Matrix in Cardiac Tissues: Implications for Long-Term Graft Durability," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 83, pp. 1641–1650, may 2007.
- [200] T. Vafaei, D. Thomas, A. Desai, L. M. Jennings, H. Berry, P. Rooney, J. Kearney, J. Fisher, and E. Ingham, "Decellularization of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration sodium dodecyl sulfate," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 44, may 2017.
- [201] K. Theodoridis, J. Müller, R. Ramm, K. Findeisen, B. Andrée, S. Korossis, A. Haverich, and A. Hilfiker, "Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves," *Acta Biomaterialia*, vol. 43, pp. 71–77, 2016.
- [202] R. W. Quinn, S. L. Hilbert, A. A. Bert, B. W. Drake, J. A. Bustamante, J. E. Fenton, S. J. Moriarty, S. L. Neighbors, G. K. Lofland, and R. A. Hopkins, "Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 92, pp. 131–137, jul 2011.
- [203] S. Cebotari, I. Tudorache, A. Ciubotaru, D. Boethig, S. Sarikouch, A. Goerler, A. Lichtenberg, E. Cheptanaru, S. Barnaciuc, A. Cazacu, O. Maliga, O. Repin, L. Maniuc, T. Breymann, and A. Haverich, "Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: Early report," *Circulation*, vol. 124, pp. 115–124, 2011.
- [204] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K. J. Halbhuber, T. Wahlers, and U. A. Stock, "Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves," *Journal of Structural Biology*, vol. 143, pp. 201–208, sep 2003.
- [205] R. Muratov, D. Britikov, A. Sachkov, V. Akatov, V. Soloviev, I. Fadeeva, and L. Bockeria, "New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. Experimental data.," *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, vol. 10, pp. 408–412, 2010.
- [206] M. Narimatsu et al., "Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells.," *Molecular and cellular biology*, vol. 21, pp. 6615–25, oct 2001.

- [207] T. K. Teague, P. Marrack, J. W. Kappler, and A. T. Vella, "IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis.," *Journal of immunology*, vol. 158, pp. 5791–6, jun 1997.
- [208] L. Zilberberg, V. Todorovic, B. Dabovic, M. Horiguchi, T. Couroussé, L. Y. Sakai, and D. B. Rifkin, "Specificity of latent TGF- β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: Role of fibrillins and fibronectin," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, pp. 3828–3836, dec 2012.
- [209] B. Hinz, "The extracellular matrix and transforming growth factor-beta1: Tale of a strained relationship," *Matrix Biology*, vol. 47, pp. 54–65, may 2015.
- [210] I. B. Robertson and D. B. Rifkin, "Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGF β secretion, sequestration, and activation," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 24, pp. 355–372, aug 2013.
- [211] R. M. Kottmann, A. A. Kulkarni, K. A. Smolnycki, E. Lyda, T. Dahanayake, R. Salibi, S. Honnons, C. Jones, N. G. Isern, J. Z. Hu, S. D. Nathan, G. Grant, R. P. Phipps, and P. J. Sime, "Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor- β ," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 186, pp. 740–751, oct 2012.
- [212] M. H. Barcellos-Hoff and T. A. Dix, "Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1.," *Molecular Endocrinology*, vol. 10, pp. 1077–1083, sep 1996.
- [213] G. R. Welch, H. L. Wong, and S. M. Wahl, "Selective induction of Fc gamma RIII on human monocytes by transforming growth factor-beta 12," *Journal of Immunology*, vol. 144, pp. 3444–3448, may 1990.
- [214] E. Liaskou, H. W. Zimmermann, K. Li, Y. Oo, S. Suresh, Z. Stamataki, O. Qureshi, P. F. Lalor, J. Shaw, W. Syn, S. M. Curbishley, and D. H. Adams, "Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics," *Hepatology*, vol. 57, pp. 385–398, jan 2013.
- [215] B. A. Högerle, M. Schneider, K. Sudrow, N. Souidi, M. Stolk, I. Werner, A. Biermann, K. G. M. Brockbank, U. A. Stock, and M. Seifert, "Effects on human heart valve immunogenicity in vitro by high concentration cryoprotectant treatment," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, jan 2017.
- [216] C. M. Overall, J. L. Wrana, and J. Sodek, "Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, pp. 1860–1869, jan 1989.
- [217] J. Varga and S. A. Jimenez, "Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor- β ," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 138, pp. 974–980, jul 1986.

- [218] M. Schneider, C. Stamm, K. G. Brockbank, U. A. Stock, and M. Seifert, "The choice of cryopreservation method affects immune compatibility of human cardiovascular matrices," *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 1–14, 2017.
- [219] R. A. Maldonado and U. H. von Andrian, "How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells," *Advances in Immunology*, vol. 108, pp. 111–165, jan 2010.
- [220] P. Kaliński, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg, "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: The concept of a third signal," *Immunology Today*, vol. 20, pp. 561–567, dec 1999.
- [221] S. Tomić, V. Kokol, D. Mihajlović, A. Mirčić, and M. Čolić, "Native cellulose nanofibrills induce immune tolerance in vitro by acting on dendritic cells," *Scientific Reports*, vol. 6, aug 2016.
- [222] L. Sprague, M. Muccioli, M. Pate, E. Meles, J. McGinty, H. Nandigam, A. K. Venkatesh, M. yu Gu, K. Mansfield, A. Rutowski, O. Omosebi, M. C. Courreges, and F. Benencia, "The interplay between surfaces and soluble factors define the immunologic and angiogenic properties of myeloid dendritic cells," *BMC Immunology*, vol. 12, p. 35, jun 2011.
- [223] G. Entrican, S. R. Wattegedera, and D. J. Griffiths, "Exploiting ovine immunology to improve the relevance of biomedical models," *Molecular Immunology*, vol. 66, pp. 68–77, 2015.
- [224] L. D. Shultz, B. L. Lyons, L. M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S. D. Gillies, M. King, J. Mangada, D. L. Greiner, and R. Handgretinger, "Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells," *Journal of Immunology*, vol. 174, may 2005.
- [225] U. Galili, "The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy," *Immunology and Cell Biology*, vol. 83, pp. 674–686, dec 2005.
- [226] C. J. Phelps et al., "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase-deficient pigs," *Science*, vol. 299, pp. 411–414, 2003.
- [227] B. P. Best, "Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions," *Rejuvenation Research*, vol. 18, pp. 422–436, oct 2015.
- [228] M. M. Fiume, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, and F. A. Andersen, "Safety Assessment of Propylene Glycol, Tripropylene Glycol, and PPGs as Used in Cosmetics," *International Journal of Toxicology*, vol. 31, sep 2012.
- [229] G. D. Elliott, S. Wang, and B. J. Fuller, "Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures," *Cryobiology*, vol. 76, pp. 74–91, 2017.

Abkürzungsverzeichnis

α -Gal	Galactose- α -1,3-Galactose
$\times g$	\times -fache Gravitationsfeldstärke (Erdbeschleunigung)
Ø Gewebe	alleinige Kultur der Aortengewebestücke (keine Immunzell-Kokultur)
AB-Serum	Serum der Blutgruppe AB
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
C4	<i>Complement Factor 4</i> , Komplementfaktor 4
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CFC	<i>Conventional Frozen Cryopreservation</i> , Konventionelle Kryokonservierung
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CXCL	C-X-C-Motiv-Ligand
DAMPs	<i>Damage/Danger-Associated Molecular Pattern</i> , Alarmine
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EC-Lösung	Euro-Collins-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
engl.	englisch

EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning (Sorting)</i> , Durchflusszytometrie
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FoxP3	<i>Forkhead Box</i> Protein 3
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
FXII	Faktor XII
GA	Glutaraldehyd
gp	Glykoprotein
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , Humanes Leukozytenantigen
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMGB1	<i>High-Mobility-Group</i> -Protein B1
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
ICOS-L	<i>Inducible Costimulator Ligand</i> , Ligand für den induzierbaren Kostimulator
IFC	<i>Ice-free Cryopreservation</i> , Eisfreie Kryokonservierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2Rgamma ^{null}	Nullallel für die Gamma-Untereinheit des IL-2-Rezeptors
KM	Konditioniertes Medium
Ko	Kontrolle
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LAP	<i>Latency Associated Protein</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LFA-3	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 3</i> , Lymphozyten-Funktions-assoziertes-Antigen 3
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> , Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> , Magnetische Zellseparation

MAT	Monozyten-Aktivierungs-Test
MCP-1	Monozyten Chemottractant Protein 1
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MTS	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
nAK	neutralisierender Antikörper
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> , Nukleärer Faktor κ B
NOD-Maus	<i>Non-Obese Diabetic</i> -Maus,
OX40-L	OX40-Ligand
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> , Pathogen-assoziierte Muster
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PFA	Paraformaldehyd
PMNs	<i>Polymorphonuclear Leukocytes</i> , Polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
Scid	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i> , Schwerer kombinierter Immundefekt
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
sIL-6R	<i>soluble IL-6-Receptor</i> , löslicher IL-6-Rezeptor
SLC	<i>Small Latent Complex</i>

SSC	<i>Side Scatter,</i> Seitwärtsstreulicht
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF	<i>Transforming Growth Factor,</i> Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP Nick-End-Labeling</i>
VIC	<i>Valve interstitial cells,</i> Valvuläre interstitielle Zellen
VS83	<i>Vitrification Solution 83,</i> Vitrifizierungslösung

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des menschlichen Herzens und der Herzklappen .	2
2	Schematische Darstellung des Wandaufbaus von Arterien	4
3	Schematische Darstellung der ablaufenden Immunreaktion nach Biomaterial- bzw. Gewebeimplantation	11
4	Paradigma der Makrophagen-Polarisation	16
5	Reinheit der isolierten Immunzellpopulationen aus peripherem Blut	42
6	Gatingstrategie zur Analyse der PMN-Aktivierung	45
7	Gatingstrategie zur Analyse der Makrophagen-Polarisation	45
8	Gatingstrategie zur Analyse der Monozyten-Charakterisierung	46
9	Gatingstrategie zur Analyse der Immunzellproliferation	46
10	Gatingstrategie zur Analyse von T _{reg}	47
11	Experimentelles Design zum Migrations-Assay	50
12	Autofluoreszenz der Makrophagen nach Kokultivierung auf Aortengewebe .	53
13	Schematische Übersicht der Präparation, Konservierung und Analyse huma- ner Aortengewebe für Immunogenitätstestungen	58
14	Einfluss der Konservierungsmethode auf die histologische Struktur und me- tabolische Aktivität humaner Aortengewebe	60
15	Endothelzellnachweis auf humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Kryokonservierung	61
16	Nachweis von HLA-DR in humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Kryokonservierung	61
17	Bestimmung nekrotischer und apoptotischer Ereignisse in humanem Aorten- gewebe nach unterschiedlicher Konservierung	62
18	Übersicht freigesetzter Zytokine und Chemokine aus humanem Aorten- gewebe	64
19	Freigesetzte Zytokine und Chemokine aus humanem Aortengewebe nach un- terschiedlicher Konservierung	65
20	Freigesetztes TGF- β 1 aus humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung	67
21	TGF- β 1-Aktivierung durch Komponenten des IFC- und CFC-Einfrier- mediums	67
22	IgG-Ablagerungen auf humanem Aortengewebe	68
23	Bestimmung des Endotoxingehalts in humanem Aortengewebe nach unter- schiedlicher Konservierung unter Verwendung unabhängiger Testsysteme .	70
24	Komplementaktivierung durch humanes Aortengewebe nach unterschiedli- cher Konservierung	71
25	Migrationsverhalten humaner Immunzellen induziert durch lösliche Gewe- befaktoren	73

26	Expression der Oberflächenmarker von humanen PMNs nach Aktivierung .	75
27	Freigesetzte Zytokine und Chemokine von humanen PMNs nach Aktivierung	76
28	Experimentelles Design der PMN-Aktivierung auf humanem Aortengewebe	78
29	Expression der Aktivierungsmarker von PMNs nach Kokultur auf humanen Aortengeweben nach unterschiedlicher Konservierung	79
30	Einfluss löslicher Faktoren der PMN-Gewebe-Kokultur auf Monozyten . .	81
31	Morphologie polarisierter humaner Makrophagen <i>in vitro</i>	83
32	Expression der Oberflächenmarker von polarisierten humanen Makrophagen	84
33	Freigesetzte Zytokine und Chemokine polarisierter humaner Makrophagen .	85
34	Experimentelles Design der Makrophagen-Polarisation auf humanem Aortengewebe	86
35	Qualitative morphologische Untersuchung der Makrophagen nach Kokultur auf humanem Aortengewebe mittels Rasterelektronenmikroskopie	87
36	Expression der Polarisationsmarker von Makrophagen nach Kokultur auf humanen Aortengeweben nach unterschiedlicher Konservierung	89
37	Expression der Polarisationsmarker von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium von humanem Aortengewebe nach unterschiedlicher Konservierung	91
38	Expression der Makrophagenmarker CD14 und CD16 nach Kokultur auf humanem CFC- und IFC-Aortengewebe unter Inhibition von TGF- β 1	92
39	Experimentelles Design zur Untersuchung der T-Zellproliferation durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC- Aortengewebe	94
40	Induktion der Proliferation humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Gewebe	94
41	Modulation der Proliferation humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe	95
42	Aktivierung humaner T-Zellen durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe	96
43	Induktion regulatorischer T-Zellen (T _{reg}) durch konditioniertes Medium von CFC- und IFC-Aortengewebe	98
44	Vorgeschlagener Mechanismus zur Erklärung der reduzierten Immunogenität von Gewebetransplantaten durch IFC gegenüber CFC	112

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete gebrauchsfertige Lösungen.	20
2	Verwendete Medien.	21
3	Verwendete Kits.	21
4	Verwendete Seren und Proteine.	22
5	Verwendete Zytokine und Reagenzien für die Immunzellkultur.	22
6	Verwendete Chemikalien.	23
7	Verwendete humanspezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie	24
8	Verwendete humanspezifische unkonjugierte Antikörper für funktionelle Assays	24
9	Verwendete humanspezifische unkonjugierte oder biotinylierte Antikörper für die Histologie	25
10	Verwendete sekundäre Antikörper für die Histologie	25
11	Angesetzte Zellkulturmedien.	25
12	Angesetzte Lösungen und Puffer.	26
13	Verwendete Materialien zur Blutabnahme.	28
14	Verwendete Verbrauchsmaterialien.	28
15	Verwendete Software.	29
16	Verwendete Geräte.	30
17	Automatisches CFC-Einfrierprotokoll für humanes Aortengewebe	31
18	Pipettierschema für zur Aktivierung des TGF- β 1 in CFC-Gewebe-KM	36
19	Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.	39
20	Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der PMN-Aktivierung.	44
21	Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der Monozyten-Charakterisierung und der Makrophagen-Polarisation.	44
22	Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse der Immunzellproliferation. .	44
23	Antikörper-Mix (anti-human) für die Analyse von T _{reg}	45
24	Antikörper (anti-human) für die Detektion des intrazellulären T _{reg} Markers.	45

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Maria Schneider

Danksagung

In den letzten Jahren, als all die Daten dieser Arbeit entstanden sind, hatte ich kontinuierlich die Möglichkeit mein Wissen und meine Fähigkeiten auszubauen. Ich durfte dabei viele tolle Menschen kennen lernen und mit diesen zusammenarbeiten.

Allen voran ist **Prof. Martina Seifert** zu nennen, die es mir ermöglichte dieses interessante Thema zu bearbeiten und in die Welt der Immunologie einzutauchen. Ich möchte ihr ganz herzlich für die wundervolle Betreuung, die unentwegte Ermutigung und Förderung sowie für den anregenden wissenschaftlichen sowie persönlichen Gedankenaustausch während der gesamten Zeit danken.

Ich möchte mich weiterhin bei **Prof. Hans-Dieter Volk** und **Prof. Ulrich Stock** für die Erstellung der Gutachten bedanken, wie auch bei **Prof. Edda Klipp** für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission und bei **Dr. Michal Or-Guil** als weiteres Kommissionsmitglied.

Bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das allzeit herzliche und hilfsbereite Miteinander. Die Arbeit im Labor, die Besprechungen großer und kleiner Probleme mit **Dr. Naima Souidi**, **Christien Beez**, **Falk Diedrichs** und **Meaghan Stolk** waren stets angenehm, produktiv und meist mit viel Lachen verbunden. Natürlich sind auch „unsere Studenten und Studentinnen“ **Victoria Reinhold**, **Matthias Fendt**, **Niklas Fellmer** und **Thao Nguyen** zu nennen, denen ich in dieser Zeit hoffentlich etwas von meinem Wissen weitergeben zu konnte. Mir hat es jedenfalls immer viel Freude bereitet und selbst zu neuen Erkenntnissen gebracht.

Mein Dank gilt unseren Kooperationspartnern aus der AG Stamm und AG Sittinger. Vor allem möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei **Prof. Christof Stamm** und **Prof. Michael Sittinger** bedanken, welche als *Mentoring-Komitee* im Rahmen der BSRT-Graduiertenschule viele konstruktive Vorschläge zum Erfolg des Projekt eingebracht haben. Weiterhin danke ich **Prof. Stamm** für die Bereitstellung des Aortengewebes aus den am DHZB durchgeführten Operationen und, dass ich durch ihn die Gelegenheit hatte, während einer Hospitation den klinischen Alltag auf Station und im OP kennen zu lernen.

Ein großes Dankeschön geht an **Dr. Sabine Bartosch** und die **BSRT-Graduiertenschule**. Durch die finanzielle Förderung, konnte ich internationale Kongressreisen oder die Durchführung des *Joint-Research-Projects* realisieren. Außerdem bekam ich durch die BSRT die Möglichkeit über den Tellerrand meines Projektes hinaus zu schauen und mein Wissen in zahlreichen Workshops zu erweitern sowie meine Fähigkeiten beispielsweise als Mitglied des Organisationskomitees für das BSRT-Symposium 2014 unter Beweis zu stellen.

Vielen Dank an **Matthias Becker**, mit dem ich im Rahmen des *Joint-Research-Projects* gut Hand in Hand gearbeitet und gefühlt unendlich viele „ELISA-Partys“ durchgestanden habe.

Bei unseren kooperierenden Forschungsgruppen von **Prof. Ulrich Stock** und **Prof. Katja Schenke-Layland** im Rahmen der DFG-Förderung möchte ich mich herzlich für den regen Austausch bedanken. Vor allem **Anna Biermann** danke ich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfestellung. Weiterhin gilt mein Dank **Dr. Kelvin Brockbank**, welcher mir das *Know How* der Kryokonservierung beigebracht hat und gute Ideen und Fragestellungen für das Projekt lieferte.

Ich danke **Dr. Désirée Kunkel** und der *FACS-Core-Facility* für die Hilfestellungen am Durchflussszytometer und **Prof. Frank Witte** für die Einführung in die Elektronenmikroskopie. Außerdem bedanke ich mich bei **Dr. Tilo Dehne** für die Bereitstellung des ImageJ-Analysenprogramms und die Hilfe bei den Auswertungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Iris Fischer** und **Dr. Laura Hildebrand**, **Dr. Krithika Hariharan**, **Su-Jun Oh**, **Bella Roßbach** und **Christos Nikolaou**, die die gemeinsamen Mittagspausen zu einer wunderbaren Auszeit aus dem Laboralltag werden ließen, meine musikalische „Karriere“ förderten, fantastische Büro-Nachbarn waren, für gute Laune, Nervennahrung und spannende „*Monday-Morning-Talks*“ sorgten und mir bei kleinen sowie großen Sorgen zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. **Meine Eltern** haben das „Werden“ der Promotion stets mit großem Interesse verfolgt, mich in jeglicher Hinsicht unterstützt, mir den Rücken gestärkt und hatten die passenden Worte parat, wenn es mal nicht so lief. Ich danke **meinen Freunden**, die in dieser Zeit den Weg mit mir gegangen sind. Lieben Dank für die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse in Berlin und dem Rest der Welt, die mir immer wieder neue Kraft geben. Ganz besonders danke ich **Paul**, der vor allem während des Endsprints für die nötigen Erholungsphasen gesorgt hat, mir geholfen hat und einfach wunderbar verständnisvoll war. Ich danke den fleißigen Korrekturlesern und allen für ihre offenen Ohren sowie die Gespräche, die mich zum Lachen und Nachdenken gebracht haben.